

**Struktur - og aktivitetsstudier  
av ulike  
fraksjoner isolert fra  
*Vaccinium macrocarpon*  
Amerikansk tranebær**



Anette Lofthus

Masteroppgave

Avdeling for Farmasøytisk Kjemi

Farmasøytisk Institutt

Det Matematisk-Naturvitenskapelige Fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

2008

**Struktur - og aktivitetsstudier  
av ulike  
fraksjoner isolert fra  
*Vaccinium macrocarpon*,  
Amerikansk tranebær**

Masteroppgave  
Avdeling for Farmasøytisk Kjemi  
Farmasøytisk Institutt  
Det Matematisk-Naturvitenskapelige Fakultet  
UNIVERSITETET I OSLO

Anette Lofthus

2008

Veildere:

1. Amanuensis Hilde Barsett  
Stipendiat Torunn H. Aslaksen  
Professor Terje E. Michaelsen

### **Forord**

Masteroppgaven ble utført ved Avdeling for Farmasøytisk Kjemi, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo og Folkehelseinstituttet.

Først vil jeg takke Hilde Barsett og Torunn H. Aslaksen for veldig god faglig og praktisk veiledning. Jeg vil også takke Terje E. Michaelsen for tilrettelegging av arbeid utført på Folkehelseinstituttet.

Videre vil jeg takke Lise-Lotte og Tone for den fine tiden vi har hatt sammen på labben og lesesalen.

I tillegg vil jeg takke alle ansatte og medstudenter på Avdeling for Farmasøytisk Kjemi for å ha bidratt til at dette har vært et hyggelig år.

Sist, men absolutt ikke minst, vil jeg takke Kristian for at du er så snill og tålmodig.

Oslo, mai 2008

Anette Lofthus

## Sammendrag

*Vaccinium macrocarpon* Aiton, amerikansk tranebær, er en vintergrønn dvergbusk som vokser vilt i østlige deler av Nord-Amerika. Planten er mye brukt innen folkemedisin, blant annet til å behandle og forebygge urinveisinfeksjoner. Nyere forskning har vist at tranebær hemmer *Escheria coli* i å feste seg til slimhinnene i urinveiene, og at de ansvarlige komponentene er proantocyanidiner. Videre er det vist at en ukjent høymolekylær polar fraksjon fra bærene kan hindre adhesjon av *Streptococcus sobrinus* til en kunstig biofilm. Det har ikke blitt utført karakterisering av høymolekylære, polare fraksjoner fra *V. macrocarpon*.

I denne studien ble det utført ekstraksjon av *V. macrocarpon* med diklormetan, 96 % etanol, 50 % etanol, vann ved 50 °C og 100 °C. Videre ble 50 % etanol rækstraktet opprenset ved adsorpsjonskromatografi på Amberlite XAD7HP, fraksjonert ved gelfiltrering på Bio-Gel P-6 DG og ionebytter ANX Sepharose 4 Fast Flow. Dette resulterte i fraksjonene 50%A1, MeAm, 50%Bg1, 50%S1, 50%S2 og 50%S3 som ble videre testet. Vannekstraktene ble dialysert, noe som resulterte i 50vdia og 100dia, og deretter fraksjonert på ANX Sepharose 4 Fast Flow. Dette ga fraksjonene 50vS1, 50vS2, 50vS3, 50vS4, 100vS1, 100vS2, 100vS3 og 100vS4.

Monosakkaridsammensetningen til rækstrakter og fraksjoner ble bestemt ved metanolyse, TMS-derivatisering og GC- analyse. Videre ble bindingsanalyse av 50%rå, 50%S1, 50vS1 og 100vS1 utført ved hjelp av karboksylsyreduksjon, hydrolyse, reduksjon, acetylering og GC-MS-analyse. Test for tilstedeværelse av arabinogalaktanproteiner ble utført ved bruk av Yariv-test på de fleste fraksjoner. Resultatene viste generelt et høyt innhold av arabinose, galaktose og galakturonsyre. Det ble dessuten påvist AGP i alle fraksjoner testet, unntatt 100vS1. Metyleringsanalysen ga ufullstendige resultater. Resultataene tyder likevel på at 50vS1 og 100vS1 inneholder noe xyloglukaner, og at det i 50vS1 er lange homogalakturonankjeder og AG-I tilstede.

Rækstraktene og de ulike fraksjonenes aktivitet i biologiske systemer ble studert. Komplementfikseringstest ble utført for å teste påvirkning på komplementsystemet, der 96%rå, 50%rå og 50%Bg1 viste høyest aktivitet. Makrofagaktivering ble studert ved hjelp av en metode basert på måling av NO-frigjøring fra makrofager. Kun 50%Bg1 viste å ha en målbar effekt på makrofagene. Agardiffusjon metode ble utført for å teste antimikrobiell aktivitet, og det ble vist at MeAm, 96 % rå og 50%rå hadde høyest antimikrobiell effekt.

## Sammendrag

---

Hemming av CYP3A4-mediert metabolisme ble studert ved bruk av mikrosomforsøk med midazolam. 96%rå, MeAm og 50%rå viste hemming av metabolismen, mens 50vrå, 100vrå og 50%Bgl viste enzymstimulering.

## Forkortelser

$\alpha$	OH-gruppen ved C-1 er trans konfigurasjon til CH <sub>2</sub> OH-substituenten ved C-5.
AG-I	Arabinogalaktan type I
AG-II	Arabinogalaktan type II
AGP	Arabinogalaktanprotein
aq	Aqua
Ar	Argon
Ara	Arabinose
Araf	Arabinofuranose
Arap	Arabinopyranose
$\beta$	OH-gruppen ved C-1 er cis konfigurasjon til CH <sub>2</sub> OH-substituenten ved C-5.
BVA	Bovin Serum Albumin
CMC	Carbodiimide
COOH	Karboksytsyregruppe
COX	Cykloxygenase
CYP	Cytokrom P-450
d	Diameter
Da	Dalton
DE	Forhold mellom forestrede galakturonsyregrupper og totalt innhold galaturonsyre
f	Furanoseform, 6-ring
FID	Flammeionisasjonsdetektor
Fuc	Fukose
g	Gass
Gal	Galaktose
GalA	Galakturonsyre
GC	Gasskromatografi
GC-MS	Gasskromatografi-Massespektrometri
Glc	Glukose
GlcA	Glukuronsyre
h	Høyde

## Forkortelser

---

HM	Høymetoksylert pektin (DE > 50 %)
HPLC-MS	High performace liquid chromatography-mass spectrometry
ICH <sub>50</sub>	Konsentrasjon som gir 50 % hemming av hemolyse
L	Lengde
LM	Lavmetoksylert pektin (DE < 50 %)
LPS	Lipopolysakkarid
Man	Mannose
MeOH	Metanol
MDZ	Midazolam
Me	Metyl
MIC	Minimum inhiberende konsentrasjon
MS	Massespektrometer
Mw	Molekylvekt
MWCO	Molecular Weight Cut Off: porestørrelse i dialyseslanger
N <sub>2</sub>	Nitrogengass
NDM	Non- dialysable material
O <sub>2</sub>	Oksyngengass
OH	Hydroksyl
1-OH-MDZ	1-OH-midazolam
4-OH-MDZ	4-OH-midazolam
4-OH-Me-GlcA	4-OH-metyl-glukuronsyre
p	Pyranoseform, 6-ring
PMII	<i>Plantago Major</i> L. fraksjon II
r	Radius
RGI	Rhamnogalakturonan type I
RGII	Rhamnogalakturonan type II
Rha	Rhamnose
Rpm	Antall rotasjoner per minutt
s	Fast stoff
SRBC	Sensitiviserte røde blodceller (fra sau)
T	Terminal
TFA	Trifluoreddiksyre
UV	Ultrafiolett lys

V	Volum
Xyl	Xylose

**Ekstrakter og fraksjoner fra *Vaccinium macrocarpon*:**

96%rå	96 % etanol ekstrakt fra <i>V.macrocarpon</i>
50%rå	50 % etanol ekstrakt fra <i>V.macrocarpon</i>
50%Am1	Fraksjon 1 etter opprensing av 50%rå på Amberlite XAD7
50%Am2	Fraksjon 2 etter opprensing av 50%rå på Amberlite XAD7
MeAm	Metanolekstrakt etter opprensing av 50%rå på Amberlite XAD7
50%Bg1	Fraksjon 1 etter gelfiltrering av 50%Am1 på Bio-Gel P-6 DG
50%Bg2	Fraksjon 2 etter gelfiltrering av 50%Am1 på Bio-Gel P-6 DG
50%S1	Fraksjon 1 etter fraksjonering av 50%Bg1 på ANX Sepharose 4 Fast Flow
50%S2	Fraksjon 2 etter fraksjonering av 50%Bg1 på ANX Sepharose 4 Fast Flow
50%S3	Fraksjon 3 etter fraksjonering av 50%Bg1 på ANX Sepharose 4 Fast Flow
50vrå	Vandig ekstrakt av <i>V. macrocarpon</i> ved 50 °C
50vdia	Dialysert 50vrå
50vS1	Fraksjon 1 etter fraksjonering av 50vdia på ANX Sepharose 4 Fast Flow
50vS2	Fraksjon 2 etter fraksjonering av 50vdia på ANX Sepharose 4 Fast Flow
50vS3	Fraksjon 3 etter fraksjonering av 50vdia på ANX Sepharose 4 Fast Flow
50vS4	Fraksjon 4 etter fraksjonering av 50vdia på ANX Sepharose 4 Fast Flow
100vrå	Vandig ekstrakt av <i>V.macrocarpon</i> ved 100 °C
100vdia	Dialysert 100vrå
100vS1	Fraksjon 1 etter fraksjonering av 100vdia på ANX Sepharose 4 Fast Flow
100vS2	Fraksjon 2 etter fraksjonering av 100vdia på ANX Sepharose 4 Fast Flow
100vS3	Fraksjon 3 etter fraksjonering av 100vdia på ANX Sepharose 4 Fast Flow.
100vS4	Fraksjon 4 etter fraksjonering av 100vdia på ANX Sepharose 4 Fast Flow



# Innhold

<b>1.</b>	<b>INNLEDNING .....</b>	<b>1</b>
1.1	TRANEBAER .....	1
1.1.1	Botanikk og utbredelse .....	1
1.1.2	Tradisjonell bruk .....	2
1.2	URINVEISINFEKSJON (UVI) .....	3
1.2.1	Etiologi og epidemiologi .....	3
1.2.2	Virulensmekanismer hos <i>E. coli</i> .....	3
1.3	FORSKNING GJORT PÅ AMERIKANSKE TRANEBAER .....	4
1.3.1	Biologiske effekter og virkningsmekanismer .....	4
1.3.2	Interaksjoner .....	9
1.3.3	Innholdsstoffer .....	10
1.4	POLYSAKKARIDER .....	10
1.4.1	Karbohydrater .....	10
1.4.2	Polysakkarider .....	11
1.4.3	Funksjon .....	12
1.5	PEKTINER .....	12
1.5.1	Opphav og funksjon .....	12
1.5.2	Struktur .....	13
1.5.3	Geldanning .....	15
1.5.4	Polysakkarider og biologisk aktivitet .....	17
1.5.5	Polysakkarider og komplementsystemet .....	17
1.5.6	Polysakkarider og makrofagaktivering .....	18
<b>2.</b>	<b>HENSIKT MED OPPGAVEN .....</b>	<b>20</b>

<b>3.</b>	<b>METODER OG MATERIALER .....</b>	<b>21</b>
3.1	GENERELLE METODER .....	21
3.1.1	Vannkvalitet.....	21
3.1.2	Innveiting.....	21
3.1.3	Filtrering.....	21
3.1.4	Sentrifugering.....	21
3.1.5	Oppkonsentrering av løsninger.....	22
3.1.6	Frysetørrking.....	22
3.1.7	Evakuering av luft fra løsninger.....	23
3.1.8	Absorbansmålinger .....	23
3.1.9	Blanding av løsninger .....	23
3.1.10	Dialyse.....	23
3.1.11	Syrevasking av utstyr.....	25
3.2	EKSTRAKSJON AV BÆRMATERIALE .....	25
3.2.1	Ekstraksjon med diklormetan .....	26
3.2.2	Ekstraksjon med 96 % etanol .....	26
3.2.3	Ekstraksjon med 50 % etanol .....	27
3.2.4	Ekstraksjon med vann ved 50 °C .....	28
3.2.5	Ekstraksjon med vann ved 100 °C .....	29
3.3	OPPRENSING OG ISOLERING AV POLYSAKKARIDFRAKSJONER .....	30
3.3.1	Adsorpsjonskromatografi.....	30
3.3.2	Gelfiltrering.....	32
3.3.3	Ionebytterkromatografi .....	35
3.4	KVALITATIV OG KVANTITATIV BESTEMMELSE AV KARBOHYDRATINNHold .....	38

3.4.1	<i>Fenol-svovelsyretest</i> .....	38
3.4.2	<i>Metanolyse</i> .....	39
3.4.3	<i>TMS-derivatisering</i> .....	40
3.4.4	<i>Gasskromatografi</i> .....	42
3.5	STRUKTUROPPLARING .....	43
3.5.1	<i>Karboksylysrereduksjon før metylering</i> .....	43
3.5.2	<i>Metylering</i> .....	45
3.5.3	<i>Hydrolyse</i> .....	47
3.5.4	<i>Reduksjon</i> .....	48
3.5.5	<i>Acetylering</i> .....	49
3.5.6	<i>GC-MS</i> .....	50
3.5.7	<i>Enkel radial gel immundiffusjon</i> .....	51
3.6	BIOLOGISK AKTIVITET .....	53
3.6.1	<i>Antimikrobiell aktivitet: Agardiffusjons-metode</i> .....	53
3.6.2	<i>Komplementfikseringstest</i> .....	56
3.6.3	<i>Mikrosomforsøk med midazolam</i> .....	60
3.6.4	<i>Måling av NO-frigjøring fra makrofager</i> .....	63
4.	<b>RESULTATER OG DISKUSJON</b> .....	<b>65</b>
4.1	EKSTRAKSJON, OPPRENSING OG ISOLERING AV POLYSAKKARIDER .....	65
4.1.1	<i>Oversikt over utført arbeid</i> .....	65
4.2	EKSTRAKSJON AV BÆRMATERIALE .....	66
4.2.1	<i>Ekstraksjon med diklormetan, 96 % etanol og 50 % etanol</i> .....	66
4.2.2	<i>Ekstraksjon med vann ved 50 °C og 100 °C</i> .....	67
4.3	ISOLERING OG OPPRENSING AV POLYSAKKARIDER.....	68

## Innhold

---

4.3.1	Adsorpsjonskromatografi: Amberlite XAD7HP .....	68
4.3.2	Gelkromatografi: Bio-Gel P-6 DG.....	69
4.3.3	Ionebytterkromatografi: ANX Sepharose 4 Fast Flow (high sub).....	71
4.4	BIOLOGISK AKTIVITET .....	73
4.4.1	Antimikrobiell aktivitet: Agardiffusjons-metode .....	73
4.4.2	Komplementfikseringstest.....	75
4.4.3	Mikrosomforsøk med midazolam.....	77
4.4.4	Måling av NO-frigjøring fra makrofager.....	79
4.5	KVALITATIV OG KVANTITATIV BESTEMMELSE AV KARBOHYDRATINNHOLD .....	80
4.5.1	Monosakkaridbestemmelse.....	80
4.6	STRUKTUROPPKLARING .....	83
4.6.1	Påvisning av arabinogalaktanproteiner.....	83
4.6.2	Bestemmelse av bindingsforhold .....	84
5.	<b>KONKLUSJON .....</b>	<b>90</b>
6.	<b>REFERANSER .....</b>	<b>92</b>

# 1. Innledning

## 1.1 Tranebær

### 1.1.1 Botanikk og utbredelse

Tranebæplanten er en krypende, vintergrønn dvergbusk med røde bær (Lid 2005). Den vokser bortover, kan bli opptil en meter lang, og trives best i myra. Blomstring skjer i mai-juni. Bærene er burgunderfargede, tåler godt frost og smaker surt (Bruset og Tveiten 1999).

I Norge finnes det to arter av tranebær, nemlig stortranebær (*Oxycoccus palustris* Pers.) og småtranebær (*Oxycoccus microcarpus* Turcz. Ex Rupr.) Disse tilhører lyngfamilien (*Ericaceae*) og tranebærslekten (*Oxycoccus* Hill). De står dessuten nær bærlyngslekten (*Vaccinium*), og blir ofte regnet dit (Lid 2005).

Det finnes også en annen art som kalles amerikansk tranebær (*Vaccinium macrocarpon* Aiton, *Oxycoccus macrocarpos* (Aiton) Pursh). Denne arten har større bær og blader enn artene som vokser i Norge. Amerikansk tranebær vokser vilt i østlige deler av Nord- Amerika (Fagredaksjon i NONA 2001, Hjelmstad 2008, Natural resources conservation services).

Rike	<i>Plantae</i>
Divisjon	<i>Magnoliophyta</i>
Klasse	<i>Magnoliopsida</i>
Underklasse	<i>Dilleniidae</i>
Orden	<i>Ericales</i>
Familie	<i>Ericaceae</i>
Slekt	<i>Vaccinium</i>
Art	<i>Vaccinium macrocarpon</i> Aiton

**Tabell 1.1:** Klassifisering av *Vaccinium macrocarpon* (*V. macrocarpon*.) (Natural resources conservation services).

### 1.1.2 Tradisjonell bruk

Historien sier at hollandske nybyggere i Amerika så at tranene under parringsleken om våren spiste tranebær på myra, og ga dem derfor navnet tranebær (cranberry). Indianerne kalte bærene *I-brimi*, som betyr bittert bær (Skard 2005).

Amerikansk tranebær blir dyrket i stor skala i nordvestlige deler av USA. Her har tranebær tradisjonelt blitt brukt i syltetøy og som smakstilsetning i mat. Spesielt under høsttakkefesten brukes det mye tranebærsauser og gelér (Fagredaksjon i NONA 2008, Hjelmstad 2008).

Indianerne i Nord-Amerika lærte de europeiske innvandrerne å bruke tranebær som et middel mot skjorbuk. I amerikansk folke-medisin ble tranebær knust og påført svulster, og fruktene ble også brukt i grøtomslag på sår. Det er dessuten kjent at tranebær har blitt brukt som et middel mot helvetesild. Avkok av planten har også blitt brukt mot kviser. Mest kjent er nok likevel den lange tradisjonen for bruk av tranebær til forebygging og behandling av urinveisinfeksjoner. Som medisinsplante brukes tranebær i dag nesten utelukkende til å behandle og forebygge nyre-og urinveisinfeksjoner, særlig blærekatarr. Det er da saften og det tørkede ekstraktet fra fruktene i form av kapsler som benyttes. Tranebær er i følge Urtelisten fra Legemiddelverket klassifisert som "handelsvare" (Fagredaksjon i NONA 2008, Hjelmstad 2008, Skard 2005).



**Bilde 1.1:** *V. macrocarpon* (Hartmann 2008).

### 1.2 Urinveisinfeksjon (UVI)

#### 1.2.1 Etiologi og epidemiologi

UVI refererer til tilstedeværelse av signifikant bakteriuri ( $> 100\,000$  kolonidannende bakterier /ml). Det er en fellesbetegnelse for betennelse i urinrør (urethritt), urinblære (cystitt) og nyrer (pyelonefritt). I 75 % av tilfellene er det den stavformede tarmbakterien *Escheria coli* (*E.coli*) som er årsak til infeksjonen. Hos yngre kvinner er også *Staphylococcus saprophyticus* en vanlig årsak (Jakobsen et al. 2001, Jepson og Craig 2008, Norsk legemiddelhåndbok 2007).

Ved nedre UVI er blæren betent, mens øvre UVI også involverer nyrene. Symptomer ved bakteriell cystitt er hyppig, sviende vannlating, grumsete og blodig urin. Uretritt er en tilstand der pasienten har frekvent dysuri uten den signifikante bakteriurien. Pyelonefritt oppstår ofte som en følge av cystitt med mer alvorlige symptomer og nedsatt allmenntilstand. I noen tilfeller er UVI asymptomatisk (Jepson og Craig 2008).

Utsatte grupper er nyfødte, gravide, eldre, pasienter med kateter, diabetes, multiple sklerose, immunsvikt-sykdom og abnormaliteter i urinveiene. Noen opplever resissive infeksjoner med 2-3 episoder årlig. UVI opptrer 50 ganger oftere hos kvinner enn menn. Årsaken kan være at kvinner har kortere urinrør, noe som gjør det lettere for bakterier å infisere blæren. 30 % av alle kvinner vil oppleve minst én symptomatisk infeksjon i løpet av livet (Jepson og Craig 2008).

Symptomatisk bakteriuri behandles med antibiotika. Uten behandling kan infeksjonen gi alvorlige komplikasjoner. Antibiotika administreres også som profylakse hos pasienter med resissiv infeksjon. Resistensproblematikken gjør det ønskelig å finne andre behandlingsformer (Jepson og Craig 2008, Norsk legemiddelhåndbok 2007).

#### 1.2.2 Virulensmekanismer hos *E. coli*

Bakteriell adhesjon er en viktig virulensmekanisme for bakterier. Etter at bakterien har festet seg til epitel følger kolonisering og infeksjon oppstår (Madigan et al. 2003).

De fleste Gram-negative bakterier har proteinstrukturer på overflaten som kalles fimbrier. Dette er adhesive filament organeller med lektiner som spesifikt binder seg til reseptorer på humane celler. En bakterie kan ha mellom 100-500 fimbrier, og hver fimbrie kan bestå av opptil 1000 subenheter. Uropatogene stammer av *E.coli* kan uttrykke ulike fimbrieffaktorer som P, S, F1C, Dr og type 1 fimbrier. Type 1 og P er viktige i patogenesen av UVI (Connel og Klemm 2000, Madigan et al. 2003).

Nesten alle *E.coli* stammer uttrykker type-1 fimbrier. De binder seg spesifikt til D-mannosylerte glykoproteiner. Det er vist at de også kan binde seg til ikke-glykosylerte peptid epitoper. Fimbriene medierer adherens til uroepitel (Connel og Klemm 2000, Nowack 2007).

P fimbrier er ofte assosiert med mer alvorlig grad av UVI som urosepsis, akutt pyelonefritt og tilbakevendende infeksjon. De gjenkjenner globoserier på glykolipidreseptorer, og binder seg til spesifikke galaktoseenheter på uroepitelceller og røde blodceller. P fimbriene kan, i tillegg til å være viktig for adhesjon til uroepitel, også ødelegge syntese og sekresjon av IgA i nyreepitel (Connel og Klemm 2000, Nowack 2007).

## 1.3 Forskning gjort på amerikanske tranebær

### 1.3.1 Biologiske effekter og virkningsmekanismer

#### Urinveisinfeksjon

I 1923 ble det rapportert at etter inntak av svsker og tranebær hos to friske frivillige sank pH i urinen. Det ble påvist en høy økning i konsentrasjon av organiske syrer og hippursyre. Videre ble det i 1933 vist at mengde hippursyre i urinen var proporsjonal med mengde inntatte bær, og at hippursyren ble dannet fra kininsyre. Det ble ikke påvist noen særlig senkning av pH i urinen (Lowe og Fagelmann 2001). Senere studier har også vist at inntak av tranebærjuice i tolerante mengder ikke kan føre til en så betydelig surgjøring at bakterier vil dø (Harkins 2000).

Lenge trodde man at den antibakterielle effekten til tranebær skyldtes hippursyre som er en sterk bakteriostatisk agent (Harkins 2000). I dag har man gått bort fra denne teorien, fordi



## 1. Innledning

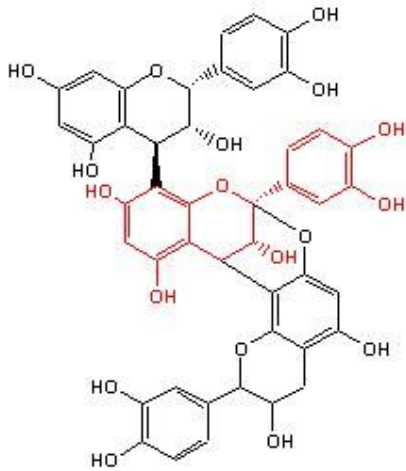
---

studier viser at det kun er en liten forbigående endring i konsentrasjon ved inntak av bærene. Teorien som råder i dag er at tranebær hindrer bakterier (særlig *E.coli*) i å feste seg til uroepitelceller i blæreveggen (Jepson og Craig 2008).

I 1984 rapporterte Sobota at inntak av tranebær førte til blokkert bakteriell adhesjon, men at tranebærs effekt på bakterier som allerede hadde festet seg var liten (Sobota 1984). Videre rapporterte Zafrifi et al. (1988) at tranebærjuice inneholder to forbindelser som kan hemme lektin-mediert adhesjon av uropatogener til eukaryote celler. Det ble vist at fruktose hemmet adherens av type 1 fimbriert *E.coli* og en høymolekylær, ikke-dialyserbar forbindelse hemmet binding av p-fimbriert *E.coli* (Zafrifi et al. 1988). Howell et al. (1998) rapporterte at de ukjente forbindelsene som hindret p-fimbriert *E.coli* i å binde seg var proantocyanidiner (Howell et al. 1998).

Som klasse er proantocyanidiner komplekse strukturer, med ulike flavan-3-oler (oftest katekin, epikatekin og galloylerte katekiner) bundet sammen på ulike måter. Proantocyanidiner i tranebær er primært dimere, trimere og større oligomere av epikatekin. Typisk inneholder disse molekylene to typer bindinger mellom epikatekin enhetene. B-type har 4 → 8 binding, og A-type har 4 → 8 og 2 → O → 7 binding. Kombinasjonen av bindinger gir et mangfold av tredimensjonale strukturer av forbindelsene (Neto 2007).

Det har blitt utført strukturstudier for å finne den kjemiske strukturen til de aktive proantocyanidinene med lavest molekylvekt. Tre proantocyanidin trimere ble funnet: epikatekin (4 → 6) - epikatekin (4 → 8, 2 → O → 7) - epikatekin, epikatekin (4 → 8, 2 → O → 7) - epikatekin (4 → 8) - epikatekin, og epikatekin (4 → 8) - epikatekin (4 → 8, 2 → O → 7)- epikatekin. De må altså være bundet som et A-type proantocyanidin for å ha antiadhesiv effekt (Foo et al. 2000).



**Figur 1.1:** Epikatekin (4S,8S) – epikatekin (4S,8S,2R,7R)-epikatekin (Foo et al. 2000).

Jepson og Craig (2008) har gjennomgått ti kliniske studier (1049 deltakere) der tranebærprodukter som forebyggende behandling har blitt sammenliknet med placebo, annen juice eller vann. Det viste seg at tranebær (juice og kapsler) signifikant reduserte insidens av UVI i løpet av en 12-måneders periode sammenliknet med placebo/kontroll hos kvinner med tilbakevendende infeksjoner. Effekten var imidlertid noe usikker hos eldre menn og kvinner, og pasienter med kateter. Mange av de som deltok i studien droppet ut, noe som tyder på at dette ikke er en populær behandlingsform. Optimal behandlingsslengde og dosering er ikke funnet. Det er imidlertid vist at styrken til den anti-adhesive effekten i urin er avhengig av mengde inntatt tranebærjuice (Nowack 2007). Det finnes ingen studier som sammenlikner tranebær med etablert behandling (eks. antibiotika). Teoretisk sett vil bruk av tranebær i stedet for antibiotika kunne redusere resistensutvikling (Jepson og Craig 2008).

Det har blitt vist at tranebær kan hemme vekst av ulike bakterier, inkludert *E.coli* (Lowe og Fagelman 2001). Leita et al. (2005) studerte antocyanin - og proantocyanidin rike fraksjoner fra tranebær ved bruk av agar-diffusjons metode, og rapporterte at noen bakteriearter fikk hemmet vekst (Leiao et al. 2005). I 2006 ble det imidlertid rapportert at tranebærs antimikrobielle effekt i urin er liten, og at tranebær derfor ikke kan anbefales i selve behandlingen av UVI (Tong et al. 2006).

### **Periodontal lidelse og gastritt**

Tranebærbasert behandling har blitt testet mot to andre lidelser med bakteriell årsak: periodontal lidelse/karies og gastritt assosiert med *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) (Nowack 2007).

Periodontal lidelse forårsakes av patogene bakteriers metabolske prosess i munnhulen, særlig *Streptococcus mutans*. Bakteriene aggregerer og danner biofilm på tannoverflaten (Nowack 2007). Videre skiller de ut enzymer, fruktosyltransferase (FTF) og glukosyltransferase (GTF), som danner henholdsvis fruktose og glukose. Disse fungerer som bindingssteder for nye bakterier til de harde overflatene i munnen. Bakterier kan også feste seg ved bruk av mekanismer som er sukrose-uavhengige (Steinberg et al. 2004).

Det er vist at høymolekylært, ikke-dialyserbart materiale (NDM) i tranebærjuice kan hemme aggregering av ulike orale bakterier. Fraksjonen inneholder 56,6 % karbon og 4,14 % hydrogen, er vannløselig og uten proteiner, karbohydrater og fettsyrer. I 2004 ble det rapportert at NDM hemmer GTF og FTF, noe som medfører at konsentrasjon av glukose og fruktan faller. Som en følge av dette ble *S. sobrinus* sin adhesjon til biofilm (hydroksiapatitt) hemmet. Det ble også vist at NDM hadde en hemmende effekt i sukrosefritt miljø, noe som tyder på at materialet kan ha flere virkningsmekanismer (Steinberg et al. 2004). Det er også vist at NDM kan svekke allerede dannet biofilm (Steinberg et al. 2005). *In vitro* studiene støttes av en *in vivo* studie som viste at ved bruk av tranebær som munnskyll i 6 uker sank antall spyttbakterier, særlig av *Streptococcus mutans* (Weiss et al. 2004). Det har ikke blitt utført strukturbestemmelse av NDM.

Magesår er sterkt assosiert med bakterien *H. pylori*. Det er vist at NDM kan hemme spesifikk adhesjon av *H. pylori* til humant mageepitel og slimhinne-celler, samt erytrocytter *in vitro* (Burger et al. 2002). Videre er det vist at det ikke er kryss-resistens mellom NDM og metronidazol. Det foreslås at en kombinasjon av tranebær og antibiotika kan øke utrydning av *H. pylori* (Scnmuey et al. 2004). En klinisk studie utført i et område i Kina med endemisk HP infeksjon støtter *in vitro* resultatene (Nowack 2007).

### **Antioksidant og antitumor-aktivitet**

*In vitro* studier, der ulike tumormodeller har blitt benyttet, viser at polyfenoliske ekstrakter fra *V. macrocarpon* kan hindre utvikling av kreft i bryst, tarm, prostata og lunger. Mulige virkningsmekanismer er induksjon av apoptose i kreftceller, senket invasjon og metastase som et resultat av hemming av mettaloproteinaser (MMPs), hemming av ornitin dekarboksylase (ODC) ekspresjon og hemming av inflammatoriske prosesser inkludert COX aktivitet (Neto 2007).

En av årsakene til antitumoreffekten er tranebærs høye innhold av antioksidanter. Flavonoider og fenoliske syrer har nemlig sterk antioksidanteffekt. Tranebærekstrakt er vist å kunne hemme oksidative prosesser, inkludert oksidasjon av lav-tetthet lipoproteiner (LDL) *in vitro*. Oksidasjon av LDL er et tidlig trinn i dannelsen av atheromatisk plakk i vaskulært endotel. Ved å øke LDL sin motstand mot oksidativt stress *in vivo* kan utvikling av hjerte/ kar-lidelser forhindres (Harkins 2000, Neto 2007).

*V. macrocarpon* har et høyt innhold av flavonoider, særlig quercetin glykosider. Flere studier viser at quercetin kan hemme kreftcellelinjer *in vitro*, og det antas at en stor del av tranebærs anticancer aktivitet kan tilskrives substansen. Proantocyanidiner har også vist antitumor effekt. Tranebær inneholder videre ursolsyre, en pentasyklisk triterpenoidsyre, som også er vist å kunne hemme vekst av tumor cellelinjer (Neto 2007).

Antocyanininnholdet i bær fra *Vaccinium* slekten kan være opptil 100 mg/100 g frukt. I tranebær er mesteparten av antocyaninene galaktosider og arabinosider av cyanidin og peonidin. Antocyaniner er sterke antioksidanter, og det antas derfor at de kan hemme oksidativt stress relatert til tumorutvikling. Sammenliknet med andre forbindelser i bærene har likevel antocyaninene alene vist liten direkte effekt på proliferasjon av tumorceller (Neto 2007).

Det er sannsynlig at tumor inhiberingen involverer en synergistisk aktivitet mellom quercetin, proantocyanidin oligomere og ursolsyre (Neto 2007).

### 1.3.2 Interaksjoner

#### Cytokrom P-450 - systemet

Legemidler kan deles i to grupper: de fettløselige og de vannløselige. De fettløselige substansene må metaboliseres til mer vannløselige for å kunne skilles ut i nyrene. Dette skjer hovedsakelig i leveren ved hjelp av cytokrom P-450 (CYP) enzymer der CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 og CYP3A4 er de viktigste. Dette er proteiner som omdanner legemidlene ved å oksidere dem (Rang et al. 2003).

Mange forbindelser påvirker dette systemet ved å oppregulere eller nedregulere aktiviteten til enzymene. Det kan oppstå en farmakokinetisk interaksjon når en substans og et legemiddel som metaboliseres av CYP- enzymer administreres samtidig. En enzyminduksjon vil opptre først etter noen dagers behandling, og vil føre til en senkning av legemidlets konsentrasjon i blodet. En enzymhemming vil opptre momentant, og vil oftest føre til en økt effekt av legemidlet som påvirkes. I tilfeller der det er metabolitter av legemidlet som er aktive vil man se en redusert effekt (Norsk legemiddelhåndbok 2007).

Det har blitt rapportert at pasienter som behandles med warfarin har fått blødninger ved samtidig inntak av tranebærjuice. Det er blitt spekulert i om årsaken kan være at flavonoider hemmer CYP-enzymene involvert i metabolismen av legemidlet (Lilja og Neuvonen 2007). En *in vivo* studie som tok for seg tranebærs interaksjon med R-S-warfarin, tizanidin og midazolam, substrat for henholdsvis CYP2C9, CYP1A2 og CYP3A4, viste at tranebærjuice ikke økte plasma konsentrasjonen av substansene. Effekten av warfarin var også uforandret. Forfatterne konkluderte med at det er usannsynlig at tranebær og warfarin interagerer. En *in vivo* studie har videre vist at inntak av 240 ml tranebærjuice daglig ikke endrer farmakokinetikken til cyklosporin og flurbiprofen. Disse metaboliseres av henholdsvis CYP3A4 og CYP2C9 (Lilja og Neuvonen 2007).

Motstridende resultater ble imidlertid rapportert i 2006. En studie viste at tranebærjuice hemmet CYP3A4 mediert nifedipin oksidase aktivitet i humane lever mikrosomer og rotte tarmceller *in vitro*. *In vivo* forsøk utført på rotter viste videre at komponenter i tranebærjuice endrer nifedipins farmakokinetikk, sannsynligvis ved hemming av enterisk CYP3A4 (Uesawa et al. 2006). Det kreves derfor mer forskning på dette området.

### 1.3.3 Innholdsstoffer

Tranebær har en mangfoldig fytokjemisk profil:

- Fenoliske syrer: Eks. hydroksybenzo- og hydroxycinnamic syre derivater.
- Antocyaniner: Galaktosider og arabinosider av cyanidin og peonidin.
- Flavonoler: Hovedsakelig quercetin konjugert med ulike sukre.
- Proantocyanidiner: Primært dimere, trimere og oligomere av epikatekin.
- Hydrofile karboksylsyrer: Kininsyre, malicacid, shikimicacid og sitronsyre.
- Triterpenoider: Eks. ursolsyre.
- Iridoid glykosider: Monotropein og 6,7 -dihydromonotropein.

I tillegg inneholder *V. macrocarpon* glukose, fruktose og vitamin C (Jensen et al. 2002, Neto 2007, Vvedenskaya et al. 2004). Det er ikke utført strukturstudier på høymolekylære, polare substanser fra *V. macrocarpon*.

## 1.4 Polysakkarider

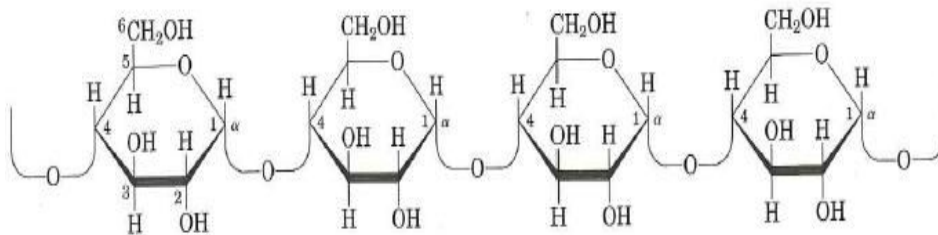
### 1.4.1 Karbohydrater

Karbohydrater er de organiske forbindelsene det finnes mest av i naturen. De er vidt distribuert i både dyre- og plantevev. Den minste karbohydratenheten er monosakkaridet. Det er et kiralt polyhydroksi aldehyd eller - keton som ofte eksisterer i en syklisk hemiacetal form. Substanser som gir slike forbindelser når de hydrolyseres defineres også som karbohydrater. Mange, men ikke alle, karbohydrater har den empiriske formelen  $(CH_2O)_n$ . Noen inneholder også nitrogen, svovel eller fosfor (Cui 2005, Nelson og Cox 2000).

### 1.4.2 Polysakkarider

Polysakkarider er høymolekylære polymere satt sammen av  $> 10$  monosakkarider. Det er likevel sjelden at polymeringsgraden er under hundre. Monomerene i kjeden er bundet sammen med glykosidbindinger (Nelson og Cox 2000).

Polysakkarider er strukturelt sett en heterogen gruppe forbindelser. De kan være sure eller nøytrale, og substituert med ulike typer organiske grupper. Videre skiller de seg fra hverandre ved å ha ulike glykosidbindinger i kjeden. Bindingene kan ha  $\alpha$  eller  $\beta$  konfigurasjon, og også ulike posisjoner. Polysakkaridene kan dessuten være lineære eller forgrenede. Ut i fra monosakkaridsammensetning deles forbindelsene i to klasser: homopolysakkarider og heteropolysakkarider. Disse består henholdsvis av kun én type monosakkarid og to/flere ulike monosakkarider. Den mest variable karakteristikken er likevel molekylvekten. Alle variasjonene skaper et nesten ubegrenset mangfold av polysakkaridstrukturer (Cui 2005, Nelson og Cox 2000, Paulsen og Barsett 2005).



**Figur 1.2:** Et segment av amylose, en lineær polymer av D-glukose med  $\alpha$  (1-4) bindinger (Nelson og Cox 2000).

### 1.4.3 Funksjon

Polysakkarider utøver en rekke funksjoner i naturen:

Polymer	Funksjon	Forekomst
Stivelse	Opplagsnæring i planter	Intracellulære granuler i planteceller
Glykogen	Opplagsnæring i bakterier og dyreceller	Intracellulært i bakterie, dyreceller
Cellulose	Strukturelt materiale i planter	Cellevegg hos planter
Kitin	Strukturelt materiale i insekter, skalldyr	Eksoskjelett hos insekter, skalldyr
Peptidoglykan	Strukturelt materiale i bakterier	Cellevegg hos bakterier
Pektiner	Eks. beskyttelsessubstans, danning av sementmatriks mellom cellevegger hos planter	Cellevegg hos planter

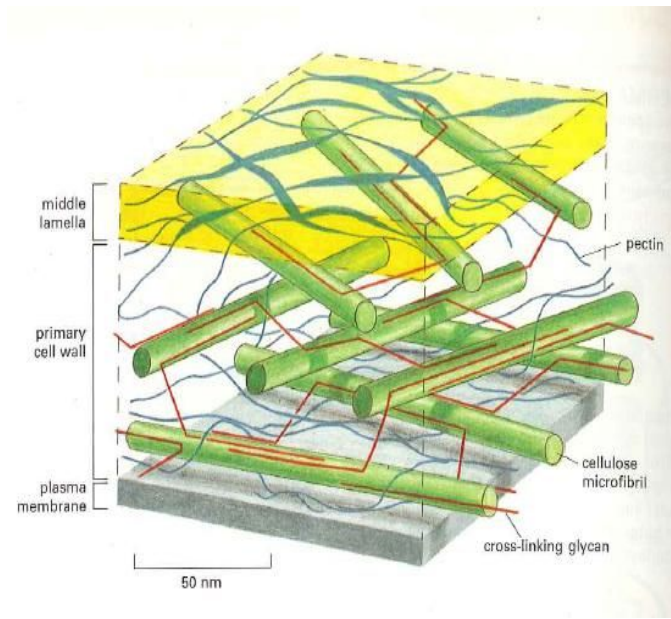
**Tabell 1.2:** *Eksempler på polysakkarider og deres funksjon* (Cui 2005, Nelson og Cox 2000).

## 1.5 Pektiner

### 1.5.1 Opphav og funksjon

Betegnelsen pektin omfatter en mangfoldig gruppe polysakkarider som finnes i primær celleveggen og intercellulære deler hos høyerestående planter (Schols og Voragen 2002). Den høyeste konsentrasjonen er i midtlamellen (Sriamornsak 2003). Disse forbindelsene bidrar til mange av celleveggens funksjoner; ionetransport, vannretensjon, bestemmelse av celleveggens porestørrelse, integritet og stivhet. Pektin bidrar også i beskyttelsesprosesser mot plantepatogener. Under plantevekst, modning, høsting og lagring vil pektinet hele tiden undergå enzymatisk og kjemisk modifisering (Schols og Voragen 2002).





**Figur 1.3:** Utsnitt av plantecelleveggen. De grønne sylindrerne illustrerer cellulosefibre som gir veggen mekanisk styrke. Andre polysakkarider (røde tråder) kryssbinder fibrene. Pektiner (blå tråder) fyller tomrommet og hindrer kompresjon. Midtlamellen er bindemiddel mellom ulike cellers cellevegger (Alberts et al. 2004).

### 1.5.2 Struktur

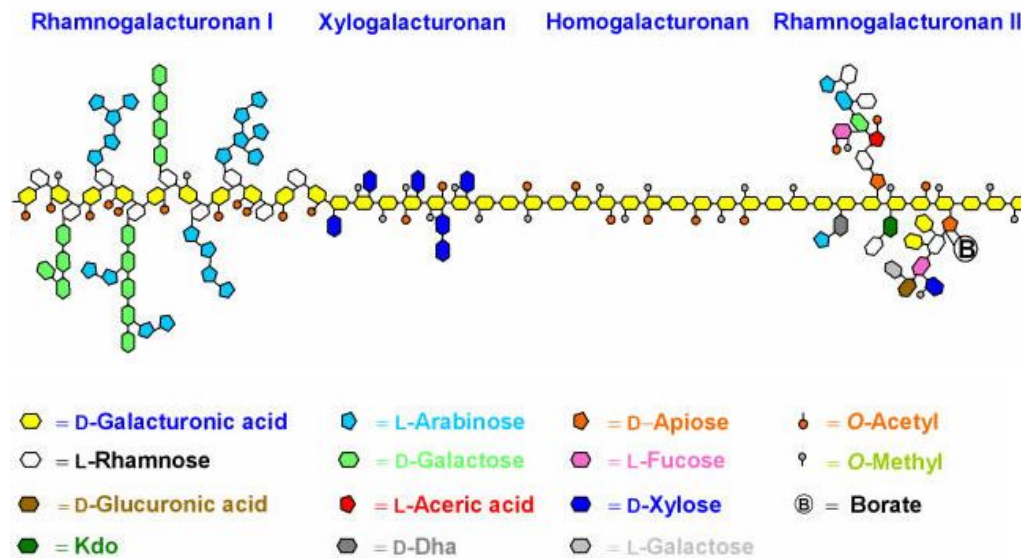
Pektinet ble oppdaget for over 200 år siden, men dets sammensetning og struktur er likevel ikke fullt ut forstått. Strukturen er vanskelig å bestemme nettopp fordi pektinet endrer seg ved isolering, lagring og prosessering av plantemateriale. Relativ mengde og nøyaktig kjemisk struktur til de ulike elementene i et pektin er avhengig av opphav og utviklingsstadium til plantevevet. Pektin kan bestå av 100 - 10 000 monosakkarider, og molekylvekten varierer fra 50 000 til 150 000 Da (Shols og Voragen 2002, Sriamornsak 2003).

Hovedkjeden i pektin består av D-galakturonsyre (GalA) bundet sammen via  $\alpha$ -(1-4) bindinger. Rhamnose (Rha) er en mindre bestanddel av pektin ryggraden og introduserer en knekk i den rette kjeden. Til Rha er det bundet sidekjeder som kan bestå av arabinose, galaktose og xylose (Sriamornsak 2003). De nøytrale sukrene er konsentrert i blokker som kalles "hårete områder". Disse områdene er separert av homogalakturonan, de såkalte "glatte

## 1. Innledning

områdene”. Forholdet mellom de ”hårete” og ”glatte” områdene varierer avhengig av plantevev og utviklingsfase (Schols og Voragen 2002).

Pektiner er svært komplekse, men har noen felles strukturelle trekk. De deles inn i grupper basert på disse strukturelle elementene. Viktige grupper er arabinaner, galaktaner, arabinogalaktan I og II og rhamnogalakturonan I og II (Paulsen og Barsett 2005).



**Figur 1.4:** Skjematisk struktur av pektin (Scheller 2007).

### Arabinaner

Hovedkjeden består av -L (1 → 5) bundne arabinofuranosylenheter. Forbindelsene kan være lineære eller forgrenede, og forgreninger er bundet via C-3 eller C-2. Arabinanene er mest sannsynlig bundet til galaktaner i pektinet, og kan frigjøres ved bruk av enzymer eller svak syrehydrolyse under ekstraksjon (Paulsen og Barsett 2005, Schols og Voragen 2002).

### Galaktaner og arabinogalaktaner

Galaktaner og arabinogalaktaner der galaktan hovedkjeden er substituert med ulike mengder galaktose eller arabinose finnes i mange høyerestående planter. Blir klassifisert som AG-I og AG-II (Schols og Voragen 2002).

### **Arabinogalaktan I og II (AG I og II)**

AG-I finnes i ulike plantevev og hovedkjeden består av  $\alpha$ -1,4 bundne galaktanenheter. Til galaktoseenhetene i posisjon 3 er det bundet sidekjeder av arabinaner. AG-I strukturen finnes hovedsakelig som en bestanddel av RG-I (Paulsen og Barsett 2005, Schols og Voragen 2002).

AG-II er mer vanlig enn AG-I og er et høyt forgrenet polysakkarid. Hovedkjeden består oftest av  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3) bundne galaktose enheter som er forgrenet med  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6) galaktan sidekjeder. Sidekjedene kan være terminert av en arabinoseenhet. Lengre kjeder med arabinose kan også være tilstede. AG-II finnes også oftest bundet til RG-I. Både AG-I og AG-II er bundet via posisjon 4 til rhamnose i pektinkjeden (Paulsen og Barsett 2005, Schols og Voragen 2002).

### **Rhamnogalakturonan I (RG I)**

Hovedkjeden i RG-I består av alternerende  $\alpha$ -1,4-bundne D-GalA og  $\alpha$ -1,2 bundne L-Rha enheter. Rhamnose i den alternerende kjeden er ofte forgreningspunkt, da i posisjon 3 eller 4, og bærer galaktan og arabinan kjeder med ulik struktur. Arabinogalaktan bundet til rhamnoseenhetene er ofte AG-II. Galaktaner kan være både 1,3 og 1, 6 bundet. Den pektiske polymeren inneholder også et ”glatt” område som består av  $\alpha$ -1,4-galakturonsyreenheter. De kan være metylert og acetylert. Det har også blitt vist at homogalakturonandelen kan være substituert, ofte med xylose (Paulsen og Barsett 2005).

### **Rhamnogalakturonan II (RG II)**

RG-II har en hovedkjede bestående av 9-10 galakturonsyreenheter som er 1,4-bundet. Til hovedkjeden er det bundet 4 ulike sidekjeder via posisjon 3 eller 4. Sidekjedene inneholder sjeldne sukre som 2-O-methylfucose, 2-O-methylxylose, apiose, aceric acid, 2-keto-3-deoksy-D-manno-octulonsic acid (KDO) og 3-deoxy-D-lyxo-2-heptulosaric acid (DHA). RG-II finnes i den primære celleveggen hos de fleste planter (Paulsen og Barsett 2005).

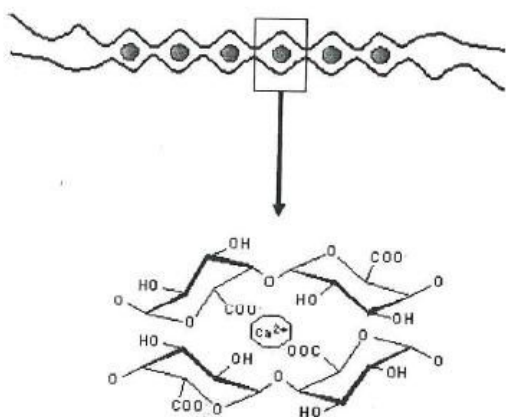
## **1.5.3 Geldanning**

Pektiner har geldannende evner. En gel er et tofasesystem som består av et tredimensjonalt polymernettverk og et løsningsmiddel. Løste stoffer og væske holdes inne i nettverket (Florence og Attwood 1998).

## 1. Innledning

Syregruppene i homogalakturenan er i ulik grad forestret med metanol. Forholdet mellom forestrede GalA grupper og det totale innholdet av GalA kalles DE. På grunnlag av dette bestemmes det om pektinet er høymetoksyliert (HM) ( $DE > 50\%$ ) eller lavmetoksyliert (LM) ( $DE < 50\%$ ). LM og HM-pektiner danner gel på ulike måter (Schols og Voragen 2002, Sriamornsak 2003).

LM-pektiner geler ved at polyvalente ioner (eks  $Ca^{2+}$ ) danner bro mellom polymerkjedene. Det dannes bindingssoner, "junction-zones", ved at nærliggende galakturonaner bindes sammen intermolekylært. GalA monomere fra kjedene kryssbindes ved hjelp av elektrostatiske krefter og ionebindinger mellom karboksylsyregruppene. Oksygenatomene deltar i bindingsprosessen ved bruk av sine frie elektronpar. Bindingene er stabile når det er minst sju karboksylsyregrupper tilstede som ligger etter hverandre på innsiden av hver utfelte kjede. Tilstedeværelse av metylestergrupper i den primære pektinhovedkjeden vil begrense omfanget av bindingssoner og dermed geldanningen (Sriamornsak 2003).



**Figur 1.5:**  $Ca^{2+}$  danner bro mellom polygalakturonansekvenser (Schols og Voragen 2002).

HM-pektiner danner gel ved hjelp av hydrofile og hydrofobe interaksjoner mellom estergruppene på pektinkjedene i surt miljø eller ved tilstedeværelse av sukrose. Ved nøytral/svakt sur pH er de uesterifiserte karboksylsyregruppene delvis ionisert. Ioniserte grupper gir molekylet en netto negativ ladning. I tillegg er det mange OH-grupper tilstede, og molekylet trekker derfor til seg vann. Pektinmolekylene negative ladning kan føre til så sterke frastøtende krefter at pektinkjedene hindres i å bygge et nettverk (Sriamornsak 2003).

Hvis det tilsettes syre vil karboksylsyregruppene ioniseres, og antall negative ladninger synker. Dermed senkes de frastøtende kreftene mellom pektinkjedene, og tiltrekningen mellom pektinkjeder og vannmolekyler nedsettes. Sukker vil videre senke hydratiseringen av pektinet fordi det trekker til seg vann. Disse betingelsene senker pektinets mulighet til å holde seg dispergert. Når dette ustabile systemet avkjøles, vil pektinet danne en gel (Sriamornsak 2003).

### 1.5.4 Polysakkarider og biologisk aktivitet

Innen tradisjonell medisin har planter i alle tider blitt benyttet til behandling av ulike sykdommer. Moderne forskning har i den senere tid vist at mange av disse plantene inneholder polysakkarider med ulik biologisk aktivitet. Interessen for bioaktive polysakkarider fra planteriket er derfor økende (Paulsen og Barsett 2005).

Ulike pektiske polysakkarider isolert fra planter er vist å ha immunstimulerende effekt, herunder påvirkning av komplementsystemet, makrofager, NK-celler og T-lymfocytter. I tillegg er det vist at pektiner har sårhelende, kolesterolsenkende og anti-metastase aktivitet. Aktive pektiner inneholder ofte en hovedkjede av RG-I med sidekjeder av AG-II. Noe sjeldnere er AG-I knyttet til RG-I kjeden. Rene AG-II og RG-II molekyler er også påvist virksomme. Selv om det har blitt utført flere struktur/aktivitets-studier, er det kun i noen få tilfeller det spesifikt er bestemt hvilke strukturelle elementer som er ansvarlig for effekt (Paulsen og Barsett 2005).

### 1.5.5 Polysakkarider og komplementsystemet

Komplementsystemet er kroppens hovedforsvarsmekanisme mot ekstracellulære bakterier. Det består av over 30 plasmaproteiner som sirkulerer i blodet i en inaktiv form, der C1-C9 er sentrale komponenter. Systemet kan aktiveres via tre ulike veier; den klassiske, alternative og lektinveien (Parham 2005).

Den klassiske veien aktiveres når komplement komponenten C1 binder seg til en Fc- region på IgM eller IgG som er del av et immunkompleks. Dette fører til en kaskade av proteolytisk kløyving som gjør at komponentene i systemet aktiveres. Siste trinn i prosessen er avsetning av fragmentet C3b på patogenet. Fagocytter har reseptorer på overflaten som gjenkjenner

C3b, og patogenet ødelegges ved fagocytose. Alternativt dannes det såkalte terminale komplekset, som består av komponentene C6-9. Dette lager porer i cellen og dreper patogenet direkte (Parham 2005).

Patogener kan også trigge komplementaktivering via veier som ikke involverer antistoff, og kan derfor ses på som en del av det medfødte immunsystemet. Lektinveien aktiveres når mannose-bindende lektin (MBL) binder seg til karbohydrater på mikrobielle overflater. Den alternative veien aktiveres ved tilstedeværelse av komponenter på mikrobeoverflater. Første trinn er da en spontan hydrolyse av komponenten C3. Deretter følger en kaskade av proteolytisk kløyving og fragmentet C3b avsettes på patogenet. Både den alternative og lektinveien resulterer i økt fagocytose og direkte lyses av patogenet. Hovedforskjellen på de tre kaskadeveiene er derfor i initieringen (Parham 2005).

Planteekstrakter kan føre til komplementaktivering og/eller hemme komplementfaktorer. De kan påvirke klassisk aktiveringsvei, alternative aktiveringsvei og lektin aktiveringsvei. Det foreligger ulike rapporter om mulige virkningsmekanismer av plantepolysakkarider. Noen virker på klassisk, noen på alternative aktiveringsvei, og noen på begge. Det er foreløpig ikke beskrevet påvirkning av lektinaktiveringsveien (Michaelsen et al. 2000).

AG-II er vist å være viktig for komplementaktiviteten. Ikke alle polysakkarider som inneholder dette elementet utøver effekt, og det antas derfor at andre faktorer også spiller inn. Plassering og størrelse av AG-II kan være viktig, og det er også mulig at strukturen kan inneholde flere bindingssteder. Det er dessuten vist at tilstedeværelse av homogalakturonan kan nedregulerende aktiviteten (Paulsen og Barsett 2005).

### **1.5.6 Polysakkarider og makrofagaktivering**

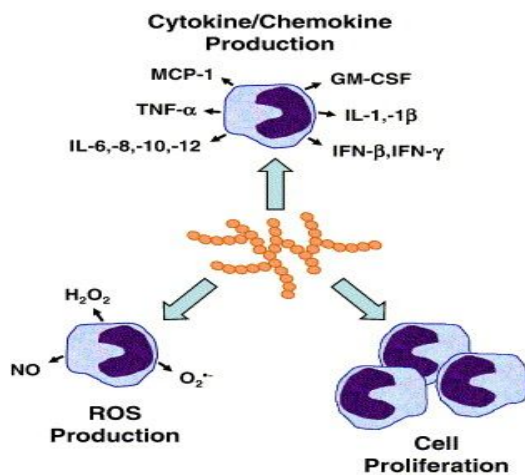
Makrofager er store mononukleære celler som finnes i de fleste vev. De utvikles fra monocytter, og er blant de første cellene som responderer på et invaderende patogen. Makrofagene er derfor en del av det medfødte immunsystemet. I tillegg fungerer de som profesjonelle antigen-presenterende celler for T-lymfocytter, og er derfor også viktige i den spesifikke immunresponsen. De gjenkjenner et patogen via spesifikke reseptorer, og skiller ut cytokiner og andre substanser som rekrutterer effektorceller, særlig nøytrofiler, inn i det

## 1. Innledning

infiserte området. De infiltrerte cellene gir en inflammasjonstilstand i vevet. Makrofagene skiller blant annet ut NO som bidrar til inflammasjon og vevsskade. Selv dreper makrofagene patogenet ved fagocytose. Makrofager er også involvert i embryogenese, sårheling, fjerning av døde celler og hematopoese (Parham 2005, Schepetkin og Quinn 2006).

Studier har vist at polysakkarider fra høyerestående planter har makrofagaktiverende evne. De øker makrofagenes cytotoksiske aktivitet mot tumorceller og mikroorganismer, aktiverer fagocytosen, øker produksjon av reaktiv oksygen substans (ROS), nitrogenoksid (NO), cytokiner og kjemokiner (Schepetkin og Quinn 2006).

Makrofagaktiveringen medieres primært ved gjenkjenning av plantepolysakkarider /glykoproteiner via de spesifikke reseptorene på makrofagens overflate. Dette er Toll-like reseptor 4 (TLR4), CD14, komplementreseptor 3 (CR3), scavenger reseptor, dektin 1 og mannose reseptor. Aktivering av reseptorene fører til transkripsjon av over hundre ulike gener, og dette resulterer i sekresjon av de ulike substansene (Schepetkin og Quinn 2006).



**Figur 1.6:** Polysakkarider i planter kan påvirke ulike makrofagresponser. IL: interleukin, IFN: interferon, TNF: tumor nekrosefaktor, GM-CSF: granulocytt/makrofag - kolonistimulerende faktor, MCP-1: monocytt kjemoattraherende protein-1, NO: nitrogenoksid (Schepetkin og Quinn 2006).

## 2. Hensikt med oppgaven

Hensikten med oppgaven er å isolere ulike fraksjoner fra *Vaccinium macrocarpon* på grunnlag av størrelse og ladning, og deretter utføre en karakterisering av de høymolekylære fraksjonene. Videre skal det ses på struktur relatert til biologisk aktivitet, inkludert effekt på immunsystemet, påvirkning av CYP-enzymmer og hemming av bakterievekst. Det er ikke tidligere utført strukturstudier på polare, høymolekylære substanser fra *Vaccinium macrocarpon*. Resultater fra strukturbestemmelsene vil derfor danne et grunnlag for videre forskning.



## **3. Metoder og materialer**

### **3.1 Generelle metoder**

#### **3.1.1 Vannkvalitet**

Det ble benyttet destillert vann i alle metoder (Renset med Elix® millipore med Progard® 2 w/o polyfenol filter).

#### **3.1.2 Innveing**

Analysevekt: Sartorius BP 221S

#### **3.1.3 Filtrering**

Glassfiberfilter: Filters, Circles, 110 mm Ø (Whatman® Schleider & Schnell).

Mikrofilter: Acro® 50 A , Filter device, 5 µm (Pall life science),  
Syringe driven Filter Unit, 0,22µm (Millex® GP),  
Durapore® membrane Filters, 0,22 µm GV (vandig) (Millipore).

Ved store væskemengder ble filtrering utført med nutsj, vannstrålepumpe og glassfiberfilter.

Ved små væskemengder ble det benyttet sprøyte og mikrofilter.

#### **3.1.4 Sentrifugering**

- Sentrifuge: Rotana 460 R (Beckman) (Måling av NO-frigjøring av makrofager, metode 3.6.4)
- Sentrifuge: Multifuge 4 KR (Heraeus) (Alle metoder)

#### 3.1.5 Oppkonsentrering av løsninger

**Prinsipp:**

Løsningsmidlet i en prøveløsning kan fjernes ved fordampning. Dette vil føre til en oppkonsentrering av stoffet i løsningen.

**Utstyr:**

Rotavapor (Büchi RE)

Rundkolbe

**Prosedyre:**

Prøveløsningene dampes inn under vakuum ved 40 °C.

#### 3.1.6 Frysetørking

**Prinsipp:**

Man ønsker ofte å fjerne vann fra prøver. Dette gjøres ved først å fryse ned prøven og deretter utsette den for vakuum. Vannet vil da fjernes ved sublimasjon. Metoden kan blant annet benyttes til å beregne konsentrasjon i en løsning (mg/ml).

**Utstyr:**

Metanolbad: Hetofrig nedkjøler (Heto Birkerød)

Frysetørker: Alpha I-4 (Christ)

Rundkolbe

**Prosedyre:**

1. En rundkolbe ble tarert.
2. En kjent mengde prøveløsning ble overført til en rundkolbe.
3. Denne ble rotert i metanolbad ved - 40 °C til det dannet seg en kappe av is på innsiden av kolben og all løsning var fryst.
4. Rundkolben ble plassert på frysetørkeren og tørket over natten.
5. Konsentrasjon i opprinnelig løsning kunne hvis ønskelig beregnes.

#### 3.1.7 Evakuering av luft fra løsninger

Luft ble fjernet fra løsninger ved en av disse metodene:

- under vakuum med vannstrålepumpe
- fortrengning med He (g), N<sub>2</sub> (g) eller Ar (g).

#### 3.1.8 Absorbansmålinger

Absorbansmålinger ble utført på:

- Microplate reader Model 3550 (BioRad) (fenol-svovelsyretest, metode 3.4.1)
- Thermomax microplate reader (Molecular Devices) (komplementfikseringstest, metode 3.6.2)
- Titerek multiscan (måling av NO-frigjøring fra makrofager metode, 3.6.4)

#### 3.1.9 Blanding av løsninger

Løsninger ble blandet på:

- Whirlimixer (Fisons)
- Vibrax-VKR (IKA Labortechnik)

#### 3.1.10 Dialyse

##### **Prinsipp:**

Ved dialyse renses løsninger for salter og andre lavmolekylære forbindelser. Dialyseslanger består av en semipermeabel membran med en gitt porestørrelse. Små molekyler vil diffundere ut gjennom porene og vann diffunderer inn i slangen. Dette skjer fordi systemet vil søke å utjevne konsentrasjonsforskjellen mellom vann og prøveløsning. Det er derfor viktig å skifte dialysevann ofte. Slangene ble grundig vasket før bruk for å fjerne forurensninger som cellulose og glycerol.

### 3. Metoder og materialer

---

#### **Reagenser:**

2 % NaOH (aq) (AnalaR)

0,05 % NaN<sub>3</sub> (aq) (Merck)

AgNO<sub>3</sub> (aq), mettet (Merck)

#### **Utstyr:**

Varmeplate med magnetrører (RCT basic, IKA labortechnik)

Begerglass 5 l

Dialyseslanger: Spectra/por®, MWCO: 3500 d: 29 cm (Spectrum laboratories Inc, USA)

Dialyseklemmer

Plasttrakt

Glasstaver

Plastbøtter

#### **Prosedyre:**

##### **A. Vask av dialyseslanger:**

1. Slangene ble klippet til ønsket lengde, ca 100 cm.
2. De ble skylt godt i springvann, både innvendig og utvendig.
3. Slangene ble kokt i 2 % NaOH (aq) i 10 minutter.
4. Etter koking ble slangene skylt i springvann og destillert vann.
5. Slangene ble kokt på nytt, nå i destillert vann, i 10 minutter, etterfulgt av skylling med destillert vann.
6. Frem til bruk ble de oppbevart i 0,05 % NaN<sub>3</sub> (aq) ved 4 °C.

##### **B. Dialyse:**

1. Før bruk ble slangene først vasket med desillert vann, deretter lagt i destillert vann i 30 minutter for å fjerne rester av NaN<sub>3</sub> (aq).
2. Dialyseslangen ble lukket med knute i den ende enden.
3. Det ble sjekket om slangen var tett ved å fylle opp med destillert vann.
4. Slangen ble fylt 2/3 fulle med prøveløsning. Hvis prøveløsningen inneholder mye salt kan slangene sprekke hvis de er for fulle. Vann diffunderer nemlig inn når salt diffunderer ut.
5. Luftbobler ble fjernet, og slangen lukket med knute og klemme på toppen.

### 3. Metoder og materialer

---

6. Slangene ble lagt i plastbøtte og dialysert under omrøring ved 4 °C i 2-3 døgn. Det ble skiftet vann flere ganger.
7. Dialysen ble avsluttet når 2 ml av dialysevannet ikke lenger ble blakket av én dråpe  $\text{AgNO}_3$  (aq). En utfelling vil indikere tilstedeværelse av  $\text{Cl}^-$  -ioner ( $\text{AgCl}$  (s)).

#### 3.1.11 Syrevasking av utstyr

Glassutsyr oppbevart i papiremballasje kan inneholde polysakkarider, blant annet cellulose. Disse kan påvirke resultater fra karbohydratanalyser, og det utføres derfor syrevasking av utstyr som brukes til metanolyse og metylering. Syre vil spalte polysakkaridene, og etterfølgende skylling med vann vil fjerne restene av dem.

##### **Reagenser:**

37 %  $\text{HCl}$  (aq) (Merck)

##### **Utstyr:**

Varmeskap (Heraeus Instruments)

Begerglass 5 l

##### **Prosedyre:**

1. Glassutstyret ble plassert i et begerglass og dekket av  $\text{HCl}$  (aq).
2. Dette ble satt til henstand i avtrekk i 30 min.
3. Utstyret ble skylt med springvann og destillert vann, og satt til tørk ved 80 °C i 2-3 timer.

### 3.2 Ekstraksjon av bærmateriale

##### **Prinsipp:**

Diklormetan tilsettes for å løse upolare forbindelser, spesielt lavmolekylære fenoliske syrer og lipidsubstanser, fra bærmaterialet.

Ved å benytte etanol som løsningsmiddel vil upolare stoffer og lavmolekylære organiske forbindelser, som ikke løser seg i diklormetan, ekstraheres fra bærmaterialet. Ekstraksjon med to ulike styrker etanol gir to ekstrakter som inneholder forbindelser med ulik polaritet.

### 3. Metoder og materialer

---

Materialet ekstraheres med 96 % etanol i en Soxhletkolonne der etanolen resirkulerer i et lukket system. Videre ekstraheres residuet med 50 % etanol, og da vil mer polare forbindelser, for eksempel polysakkarider, ekstraheres ut. I tillegg benyttes 96 % etanol i tørkeprosessen for å prøve og trekke noe vann ut av bærene.

Vann benyttes som ekstraksjonsmiddel for å ekstrahere ut polare forbindelser fra bærmaterialet, inkludert vannløselige polysakkarider. Polysakkaridenes løselighet i vann er temperaturavhengig, og det blir ekstrahert ved 50 °C og 100 °C. Det dannes derfor to ulike fraksjoner.

#### 3.2.1 Ekstraksjon med diklormetan

**Reagenser:**

Diklormetan (Merck)

**Materiale:**

Fresh cranberries (*Vaccinium macrocarpon*) (Ocean Spray, USA).

**Utstyr:**

Begerglass 5 l

**Prosedyre:**

1. 3740 g bær ble tint fra dypfryst tilstand.
2. Bærene ble delt i to, tilsatt diklormetan, og satt til henstand i et begerglass i 24 timer.
3. Diklormetan ble dekantert fra.
4. Det ble tilsatt ny diklormetan.
5. Etter 24 timer ble diklormetan dekantert fra.
6. Bærene ble lagt til tørk i avtrekkskap i 24 timer.

#### 3.2.2 Ekstraksjon med 96 % etanol

**Reagenser:**

96 % etanol (Farmasøytisk institutt)

### 3. Metoder og materialer

---

#### **Utstyr:**

Morter og pistill

Kvernemaskin

Varmeskap (Heraeus Instruments)

Varmemantel

Rundkolbe 2 l

Soxhletfilter for prøvemateriale

Soxhletekstraktor

Tilbakekjøler

#### **Prosedyre:**

1. Bærmaterialet etter diklormetaneekstraksjon (metode 3.2.1) ble tilsatt 96 % etanol og satt til henstand i 72 timer.
2. 96 % etanol ble dekantert fra.
3. Bærene ble knust i morter, tilsatt 96 % etanol og satt til henstand i 24 timer.
4. Etanolen ble dekantert fra, dampet inn og fryst ned.
5. Bærene ble lagt til tørk i avtrekkskap i 24 timer, deretter i varmeskap ved 40 °C i 24 timer.
6. Bærene ble kvernet til pulver.
7. 289,57 g pulverisert bærmateriale ble delt i to porsjoner.
8. Rundkolben ble fylt med 1 l etanol.
9. Den ene halvparten av bærmaterialet ble ekstrahert i det lukkede systemet i 2 dager til ekstraktet var fargeløst. Systemet ble slått av om kvelden.
10. Dette ble gjentatt med siste halvdel av materialet.
11. Ekstraktene ble slått sammen, dampet inn og fryst ned.

#### **3.2.3 Ekstraksjon med 50 % etanol**

#### **Reagenser:**

50 % etanol (Farmasøytisk institutt)

#### **Betingelser:**

Sentrifugering ved 1000 G, 4 °C, 10 min.

### 3. Metoder og materialer

---

#### **Utstyr:**

Varmemantel (BI Barnstead Electrothermal)

Kokstein

Rundkolbe 2 l

Tilbakeløpskjøler

Sentrifugebeholder 1 l (Heraeus)

Glassfiberfilter

Nutsj og vannstrålepumpe

#### **Prosedyre:**

1. Pulverisert bærmateriale ( $m = 145,89$  g) etter ekstraksjon med 96 % etanol (metode 3.2.2) ble delt i to porsjoner.
2. Halvparten av bærmaterialet ble tilsatt 1,5 l etanol og kokt i 1 time i rundkolbe på varmemantel.
3. Etanolekstraktet ble dekantert fra.
4. Ekstraktet dannet gel som ble løst ved å sentrifugere like mengder gel og vann i en sentrifugebeholder. Supernatanten ble dekantert fra. Dette ble gjentatt til all gelen hadde løst seg.
5. Noe av etanolen ble dampet bort og det resterende ekstraktet ble filtrert.
6. Ekstraktene ble slått sammen, dampet inn og fryst ned.
7. Det ble utført 14 runder med ekstraksjon.
8. Prosedyren ble så gjort med den resterende halvdelen av pulveret.

#### **3.2.4 Ekstraksjon med vann ved 50 °C**

#### **Betingelser:**

Sentrifugering ved 4000 rpm/min, 8 °C, 20 min.

#### **Utstyr:**

Begerglass 5 l

Varmeplate med magnetrører (RCT basic, IKA labortechnik)

Temperaturmåler

Glassfiberfilter



### 3. Metoder og materialer

---

Nutsj og vannstråleoppsats

#### **Prosedyre:**

1. Bærmaterialet etter ekstraksjon med 50 % etanol (metode 3.2.3) overført til et begerglass og tilsatt 3 l vann.
2. Dette stod med røring ved 50 °C i 1 time. Temperatur ble nøye kontrollert.
3. Vannekstraktet ble dekantert fra, sentrifugert og filtrert.
4. Det ble utført 3 runder med ekstraksjon.
5. Ekstraktene ble slått sammen, dampet og fryst ned.

#### **3.2.5 Ekstraksjon med vann ved 100 °C**

#### **Betingelser:**

Sentrifugering ved rpm/min, 8 °C, 20 min.

#### **Utstyr:**

Rundkolbe 5 l

Varmemantel (BI Barnstead Electrothermal)

Tilbakeløpskjøler

Kokstein

Glassfiberfilter

Nutsj og vannstrålepumpe

#### **Prosedyre:**

1. Bærmaterialet etter ekstraksjon med vann ved 50 °C (metode 3.2.4) ble overført til en rundkolbe, tilsatt 2 l vann og satt til koking i 1 time.
2. Vannekstraktet ble dekantert fra, sentrifugert og filtrert.
3. Det ble utført 3 runder med ekstraksjon.
4. Ekstraktene ble slått sammen, dampet inn og fryst ned.

## 3.3 Opprensing og isolering av polysakkaridfraksjoner

### 3.3.1 Adsorpsjonskromatografi

(Sirnes 2003)

#### **Prinsipp:**

Metoden baserer seg på adsorpsjonskromatografi. Dette er en metode der et finfordelt adsorpsjonsmiddel fungerer som stasjonærfase og mobilfasen oftest er en væske. Affinitet til stasjonærfase skyldes svake kovalente bindinger, hydrogenbindinger, dispersjonskrefter og dipolinteraksjoner. Separasjonen er avhengig av at stoffene har ulik grad av affinitet til stasjonærfasen og at interaksjonen er reversibel. Forbindelser med lav affinitet vil elueres ut raskere enn de som bindes sterkt til stasjonærfasen. Polysakkarider elueres ut med vann. Metoden brukes til å rense og fraksjonere 50 % etanolekstraktet.

#### *Amberlite XAD7HP*

(Sigma-Aldrich 2007)

Amberlite XAD7 er en ikke-ionisk og moderat polar resin av akrylester. Materialet kan adsorbere hydrofobe stoffer fra vann, eller hydrofile stoffer fra ikke-vandige systemer. Det adsorberer og frigir ioniske forbindelser ved hydrofobe og polare interaksjoner, og kan benyttes for forbindelser med molekylvekt opptil 60 000 Da. Materialet har partikkelstørrelse 20-60 mesh (wet).

#### **Reagenser:**

Metanol (Merck)

Aceton: vann (70:30) (Chemi Teknink)

0,1 % trifluoreddiksyre (TFA) (Pierce) i metanol

#### **Betingelser:**

Fraksjonering: 10 ml per rør

Elueringsmiddel: vann

### 3. Metoder og materialer

---

#### Utstyr:

Kolonne:	V = 100 ml
Matriks:	Amberlite XAD7HP (Sigma), 100 g
Sprøyte:	BD Plastic 10 ml
Oppsamlingsrør:	Sentrifugerør 10 ml (Heger), 50 stk.

#### Prosedyre:

##### A. Pakking av kolonne:

1. 100 g kolonnemateriale og 100 ml metanol ble rørt sammen i et begerglass, deretter helt over i kolonnen.
2. Luftbobler ble ristet bort.
3. Kolonnen ble vasket med 500 ml metanol og deretter 500 ml vann.

##### B. Eluering:

1. En vannhøyde på  $< 0,5$  cm stod over pakkematerialet da 25 ml prøveløsning ble applisert sakte på kolonnen.
2. Etter prøveapplikasjon ble vann tilsatt forsiktig slik at pakkematerialet ikke virvlet for mye.
3. De første fem fraksjonene ble samlet opp med sakte drypp, deretter ble kolonnen satt på maks drypp.
4. Karbohydratinnholdet i hvert rør ble bestemt ved hjelp av fenol-svovelsyretesten (metode 3.4.1)
5. På bakgrunn av dette ble eluatet fordelt på to fraksjoner.
6. Da vanneluatet var blitt fargeløst, ble kolonnen eluert med metanol til fargeløs løsning.
7. Deretter ble det eluert med minst 200 ml 0,1 % TFA i metanol til fargeløs løsning.
8. Det ble så eluert med minst 200 ml aceton: vann (70:30) til fargeløs løsning.
9. Til slutt ble det eluert med 200 ml metanol etterfulgt av 300 ml vann.
10. Luft i kolonnen ble ristet bort før ny prøve ble tilsatt.
11. Om natten stod kolonnen i metanol.
13. Prosedyren ble gjentatt til alt prøvemateriale var rensset og fraksjonert.

#### 3.3.2 Gelfiltrering

**Prinsipp:**

(Bio-Rad Laboratories 2000, Heinrich et al. 2004, Pharmacia biotech)

Gelkromatografi kalles også størrelse-eksklusionskromatografi, og stoffer separeres på grunnlag av deres ulike molekylstørrelse. En gel er et heterogent fasesystem der en kontinuerlig væskefase, oftest vandig, befinner seg inne i porene til en kontinuerlig stasjonærfase. Geler laget for gelfiltrering har porer med en bestemt porestørrelse. Porene i gelmatrix skal ha tilnærmet lik størrelse som molekylene som skal separeres. Små molekyler diffunderer inn i porene, mens større molekyler ekskluderes og passerer raskt gjennom gelen. Store molekyler elueres derfor ut i voidvolumet. Avhengig av størrelse og diffusjonsevne vil også molekyler som kan trenge inn i porene passere kolonnen med ulik hastighet. Resultatet blir at molekylene elueres etter synkende molekylstørrelse. En fordel med metoden er at man får lite tap av stoffer fordi de ikke adsorberes særlig sterkt til gelmaterialet. Dessuten finnes det en rekke geler med ulik porestørrelse tilgjengelig på markedet.

Gelfiltrering er uavhengig av konsentrasjon i prøven, men volumet av prøve i forhold til kolonnevolumet er viktig. Prøveløsningen skal ikke være for viskøs, og den skal være klar uten synlige partikler og forurensninger. Filtrering vil øke kolonnematerialets levetid.

***Bio-Gel P-6 DG***

(Bio-Rad Laboratories 2000)

Bio-Gel P gelmatriks består av et porøst polyakrylamidmateriale dannet ved en kopolymerisering av akrylamid og N, N'-metylen-bis-akrylamid. Gelen er nesten fri for ladning og svært hydrofil. Bio-Gel P-6 DG har et fraksjoneringsområde på 1000-6000 Da, og benyttes til å separere høymolekulære forbindelser fra lavmolekulære.

**Standarder:**

Dekstran T500 (Mw = 500 000 Da) (Pharmacia)

D (+) - raffinose pentahydrate (Mw = 600 Da) (Sigma)

**Betingelser:**

Elueringshastighet: 1 ml/min

### 3. Metoder og materialer

---

Fraksjonssamler: 10 min/ rør (10 ml per rør)

Elueringsmiddel: destillert vann

Alle løsninger applisert på kolonnen ble degasset.

#### Utstyr:

Kolonne:	XXK50 (GE Healthcare Biosciences AB)
	h = 26 cm
	r = 2,5 cm
	V 500 ml
Matriks:	Bio-Gel P-6 DG Desalting gel (BIO-RAD), 80 g.
Pumpe:	Pump P-1 (Pharmacia Biotech)
Fraksjonssamler:	Frac-920 (Amersham Biosciences)
Mikrofilter:	Acro 50 A filter Device, 5 µm (Pall Lifesciences)
Sprøyte:	BD Plastic 50 ml
Oppsamlingsrør	Sentrifugerør RB 10 ml (Heger), 95 stk.
Diverse	Glasstav, nutsal og vannstrålepumpe

#### Prosedyre:

##### A. Pakking av kolonne:

1. Fra kolonnevolum og tabell 2 (Bio-Rad Laboratories 2000) ble riktig mengde kolonnemateriale beregnet og innveid (80 g).
2. Dette ble forsiktig tilsatt 1 l vann i en erlenmeyerkolbe med vakumåpning og satt til svelling ved romtemperatur i 12 timer.
3. Usvellet materiale ble dekantert fra, 1 l vann ble tilsatt og gelmaterialet fikk synke. Dette ble gjentatt 3 ganger.
4. Blandingen ble degasset under vannstrålevakuum under forsiktig omrøring i 5-10 minutter.
5. Kolonnematerialet ble forsiktig helt over i kolonnen ved bruk av glasstav for å unngå luftbobler i gelen.
6. Kolonnematerialet ble pakket ved å eluere med vann (1 ml/min) i 24 timer.

### 3. Metoder og materialer

---

#### **B. Eluering av standarder:**

1. 25 mg dekstran og 50 mg raffinose ble løst i 100 ml vann, applisert på kolonnen og eluert med vann.
2. Eluatet ble samlet opp i sentrifugerør, og karbohydratinnholdet i hvert rør ble bestemt ved hjelp av fenol-svovelsyretesten (metode 3.4.1).
3. Standardkurve ble laget ved å plotte absorbans mot eluert volum.
4. Kolonnen ble rensset med 2 kolonnevolum vann.

#### **C. Eluering av prøve:**

1. 100 ml prøveløsning ble filtrert, applisert på kolonnen og eluert med vann.
2. Eluatet ble samlet opp i rør, og karbohydratinnholdet i hvert rør ble bestemt ved hjelp av fenol-svovelsyretesten.
3. Kurven ble sammenliknet med standardkurve, og rørene ble på bakgrunn av dette slått sammen.
4. De ulike fraksjonene ble fryst ned.
5. Mellom hver kjøring ble kolonnen rensset med minst 2 kolonnevolum vann.
6. Prosedyren ble gjentatt til hele prøvevolumet var fraksjonert.

#### *PD-10 kolonne*

##### **Prinsipp:**

(GE Healthcare 2007)

PD-10 er en ferdigpakket kolonne som består av Sephadex<sup>TM</sup> G-25 medium som kan separere høymolekylære (> 5000 Da) fra lavmolekylære (< 1000 Da) forbindelser. Mediet brukes til desalting av prøvemateriale.

##### **Utstyr:**

Kolonne	PD-10 (GE Healthcare)
	h: 5 cm d: 1,5 cm
Kolonnematriks	Sephadex <sup>TM</sup> G-25
Mikrofilter	Syringe driven Filter Unit, 0,22µm (Millex® GP)
Sprøyte	BD Plastic 10 ml

**Prosedyre:**

1. Kolonnen ble eluert med 25 ml vann for ekvilibrerings.
2. 2,5 ml prøveløsning ble filtrert og applisert på kolonnen.
3. Det ble eluert med 3 ml vann, som ble samlet opp og frysetørket.
4. Før påsetting av ny prøve ble det eluert med 25 ml vann.

#### 3.3.3 Ionebytterkromatografi

**Prinsipp:**

(Greibrokk 1998, Pharmacia biotech)

En ionebytter består av en uløselig matriks som er kovalent bundet til en ionisk eller ioniserbar gruppe. Til gruppen er det elektrostatiske knyttet et motion med motsatt ladning. Dette motionet kan byttes ut med andre ioner. Ionebyttere deles i anionbyttere og kationbyttere. Det finnes også dipolare og chelate ionebyttere. Anionbyttere har et kovalent bundet kation og et utskiftbart anion, mens kationbyttere har et kovalent bundet anion og et utskiftbart kation. Disse kan videre deles inn i sterke og svake ionebyttere, noe som karakteriserer syre-base styrken til den kovalent bundne gruppen. Som mobilfase benyttes vandige løsninger av salter, syrer, eller baser.

Separasjon skjer fordi substanser har ulike grad av interaksjon med materialet pga forskjell i ladning, ladningstetthet og distribusjon av ladning på overflaten. Interaksjonene kan kontrolleres ved å endre betingelser som ionestyrke og pH. Ionebytterkromatografi kan separere stoffer med en svært liten forskjell i ladning, og er derfor en veldig god separasjonsteknikk.

***ANX Sepharose 4 Fast Flow (high sub):***

(Amersham 2000)

ANX Sepharose 4 Fast Flow er en svak ionebytter der kationet er en dietylaminopropylgruppe. Matrix består av høyt kryssbundet agarose, noe som gir mediet høy kjemisk og fysisk stabilitet. Mengde agarose i dette mediet er noe lavere enn i andre ionebyttere basert på Sepharose Fast Flow, og materialet får dermed større grad av porøsitet.

### 3. Metoder og materialer

---

Negativt ladde polysakkarider binder seg til kationet, og kan så elueres ut med NaCl (aq) med økende ionestyrke. Ettersom konsentrasjon av kloridioner øker vil sterkere og sterkere elektrostatiske bindinger brytes. Nøytrale polymere interagerer ikke med ionebrytteren, og elueres ut med vann. Man får dermed en separasjon av nøytrale og sure polysakkarider, og følgelig også separasjon etter styrken av polysakkaridenes binding til kationet.

#### Reagenser:

2 M NaCl (aq), (AnalaR), filtrert

AgNO<sub>3</sub> (aq), mettet (Merck)

#### Betingelser:

Elueringshastighet fra saltløsning til blandekar 0,5 ml/min.

Elueringshastighet fra blandekar til kolonne: 1 ml/min.

Fraksjonssamler: 10 min/ rør (10 ml per rør).

Alle løsninger applisert på kolonnen ble degasset (metode 3.1.7).

#### Utstyr:

Kolonne	XK50 (GE Healthcare Biosciences AB) h = 26 cm, r = 2,5 cm, V 500 ml.
Matriks	ANX Sepharose 4 Fast Flow (high sub) (GE healthcare)
Pumpe	Perimax Spetec (Holger teknologi)
Fraksjonssamler	LKB Superfrac (Pharmacia)
Mikrofilter	Acro 50 A filter Device, 5 µm (Pall Lifesciences)
	Durapore® membrane Filters, 0,22 µm GV (vandig) (Millipore)
Sprøyte	BD Plastic 50 ml
Oppsamlingsrør	Sentrifugerør RB 10 ml (Heger), 180 stk
Diverse	Glasstav, nutsj og vannstrålepumpe

#### Prosedyre:

##### A. Pakking av kolonne:

1. 500 ml ferdigsvellet kolonnemateriale ble degasset ved bruk av vannstrålepumpe i 5-10 minutter.

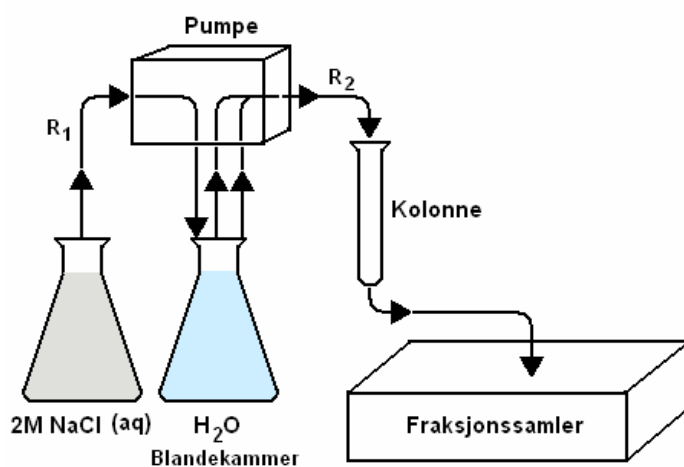


### 3. Metoder og materialer

2. Blandingen ble helt over i kolonnen ved bruk av glasstav for å unngå luftbobler i gelen.
3. Det ble eluert med 2 kolonnevolum vann. Flowhastigheten var 1 ml/min.

#### B. Eluering:

1. Prøveløsning ble filtrert og satt på kolonnen med en flowhastighet på 1 ml/ min.
2. Nøytrale molekyler ble eluert ut med 2 kolonnevolum destillert vann. De første 100 ml ble kastet, deretter ble resten samlet opp og fryst ned. Flowhastigheten var 1 ml/min.
3. Sure polysakkarider ble eluert ut med NaCl (aq)-gradient i 30 timer. Gradienten gikk fra 0-2 M.
4. Eluatet ble samlet opp i sentrifugerør..
5. Det ble utført fenol-svovelsyretest (metode 3.4.1) på eluatet for å måle karbohydratinnhold. Rørene ble på grunnlag av dette slått sammen.
6. De ulike fraksjonene ble dampet inn, dialysert (metode 3.1.10) og frysetørket (metode 3.1.6).
7. Til slutt ble det eluert med 1 kolonnevolum 2 M NaCl. Dette ble samlet opp og fryst ned. Flowfastigheten var 2 ml/min.
8. Mellom hver prøvepåsettelse ble kolonnen eluert med minst 2 kolonnevolum vann. Når 2 ml av eluatet ikke lenger ble blakket av en dråpe  $\text{AgNO}_3$  kunne det settes på ny prøveløsning.
9. Prosedyren ble gjentatt til hele prøvevolumet var fraksjonert.



**Figur 3.1:** Oppsett for generering av en NaCl-gradient. R1 = 0,5 ml/min, R2 = 1 ml/min.

## 3.4 Kvalitativ og kvantitativ bestemmelse av karbohydratinnhold

### 3.4.1 Fenol-svovelsyretest

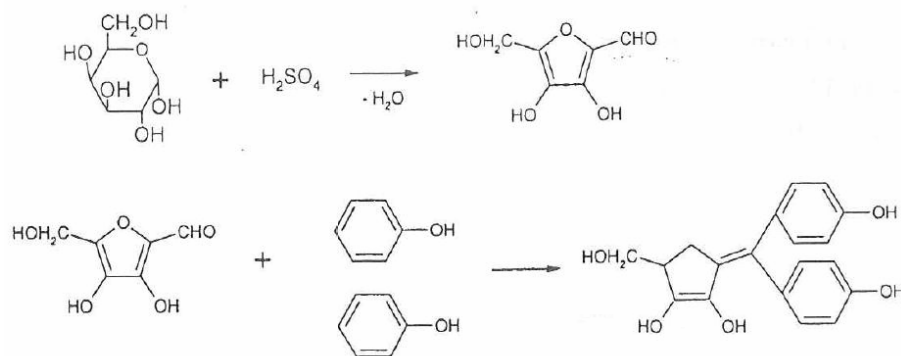
(Dubois 1956)

#### Prinsipp:

(Cui 2005)

Konsentrert svovelsyre reagerer med karbohydrater og danner furfurerivater som furanaldehyd og hydroksymetyl furaldehyd. Disse kondenserer med fenol til et stabilt gulfarget kompleks der gulfargens intensitet er proporsjonal med mengde karbohydrat. Ved å måle absorbans kan man derfor finne karbohydratinnholdet i en løsning.

Absorbansmaksimum er 490 nm for heksoser og 480 nm for pentoser og uronsyrer. Metoden brukes når karbohydrateprofilene til eluater etter blant annet adsorpsjonskromatografi, gelfiltrering og ionebytterkromatografi skal bestemmes. Absorbans plottes da mot eluert volum/ml, og på denne måten finner man hvilke fraksjoner som kan slås sammen.



**Figur 3.2:** Reaksjon mellom monosakkarid og svovelsyre til et anhydrosukker, som kondenserer med to fenolmolekyler til et gulfarget kompleks (Modifisert figur fra Inngjerdingen 2000).

#### Reagenser:

4 % fenol (aq) (Merck)

Konsentrert  $H_2SO_4$  (Merck)

#### Utstyr:

Reagensrør av glass, 6 ml

### 3. Metoder og materialer

---

Pipette: Gilson microman

Whirlimixer (Fisons)

Microtestplate 96-well, flatbunnet (Sarstedt)

Microplate Reader 3550 (BioRad)

#### Prosedyre:

1. 100  $\mu$ l eluat ble tilsatt 100  $\mu$ l 4 % fenol og 1 ml konsentrert  $H_2SO_4$  i et glass-reagensrør.
2. Løsningen ble mikset godt og satt til henstand i ½ time ved romtemperatur.
3. Løsningen ble mikset på nytt.
4. 100  $\mu$ l ble overført til en brønn på mikrotiterplaten.
5. Som blindprøve ble det benyttet 100  $\mu$ l destillert vann.
6. Absorbans ble målt ved 490 nm og plottet mot eluert volum fra kolonne.

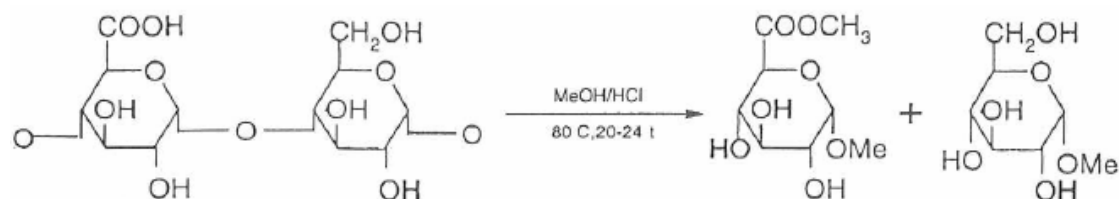
#### 3.4.2 Metanolyse

(Chambers og Clamp 1971)

#### Prinsipp:

(Cui 2005)

I et surt, vannfritt miljø av metanol brytes glykosidbindinger mellom monomere i polysakkaridet, og det dannes metylglykosider ved den frigitte reduserende enden. I tillegg dannes det metylestere av uronsyrene. Det benyttes vannfritt miljø for å unngå dekomponering ved hydrolyse.



**Figur 3.3:** Metanolyse av et surt polysakkarid til metylester og metylglykosid (Inngjerdningen 2000).

#### Reagenser:

4 M HCl i MeOH (VWR Int. Prolabo) (Sigma-Aldrich)

Vannfri MeOH (Sigma-Aldrich)

### 3. Metoder og materialer

---

Intern standard: 1 µg/µl mannitol i 1 M HCl i MeOH

#### **Utstyr:**

Supelcorør med teflonbelagt skrukork (Supelco), 4 ml

Transferpettor 50-100 µl (Brand)

SMI ® rør (blå)

Pasteurpipette 5 ml og pelesballong

P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-evakuert vakuumsiktor

Varmeenhet til tørking under N<sub>2</sub>-gass: Reacti-Therm<sup>TM</sup> III Heating module (Pierce)

Varmeskap (Heraeus)

Glassutstyr ble syrevasket (metode 3.1.11).

#### **Prosedyre:**

1. 1 mg frysetørket prøvemateriale ble veid inn i et supelcorør.
2. Prøven ble dekket med perforert parafilm og tørket i evakuert vakuumsiktor i 24 timer ved romtemperatur.
3. 1 ml 4 M HCl i MeOH og 100 µl intern standard ble tilsatt prøven før den ble satt i varmeskap (80 °C) i 20-24 timer. Etter 10 minutter ble korken skrudd godt til for å hindre fordampning.
4. Prøven ble dampet inn til tørrhet under N<sub>2</sub> (g) ved 40 °C.
5. 200 µl vannfri MeOH ble tilsatt.
6. Prøven ble dampet inn til tørrhet under N<sub>2</sub> (g) ved 40 °C.
7. Trinn 5 og 6 ble gjentatt 2 ganger.
8. Prøven ble dekket med perforert parafilm og tørket i eksiktor i minimum en time før TMS-derivatisering (metode 3.4.3).

#### **3.4.3 TMS-derivatisering**

(Sweeley et al. 1963)

#### **Prinsipp:**

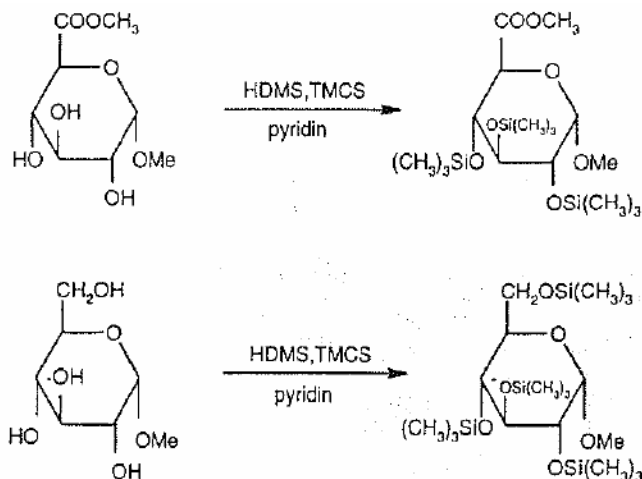
(Cui 2005)

En forutsetning for gasskromatografi er at stoffene som skal separeres er på gassform.

Monosakkarider er ikke flyktige, og må derivatiseres før en slik analyse. Hensikten med

### 3. Metoder og materialer

TMS-derivatisering er derfor å omdanne monosakkaridene til termisk stabile flyktige derivater. De frie hydroksylgruppene reagerer med heksametyldisilan og trimetyklorsilan til pertrimetylsilyleter. Som løsningsmiddel brukes pyridin.



**Figur 3.4:** Reaksjon mellom metylglykosid med og uten metylestergruppe med TMS-reagens (Inngjerdingen 2000).

#### Reagenser:

TMS-reagens:

Trimetyklorsilan (TMCS)	1 ml
(Supelco)	
HMDS (Heksametyldisilan)	2 ml
(Aldrich)	
Pyridin (Merck)	5 ml

#### Utstyr:

Transferpettor 50-100  $\mu\text{l}$  (Brand)  
SMI ® rør (blå)  
Whirlimixer (Fisons)  
Glassutstyr ble syrevasket (metode 3.1.11).

#### Prosedyre:

1. Metanolyserte prøver (metode 3.4.2) ble tilsatt 200  $\mu\text{l}$  TMS- reagens og mikset godt.

### 3. Metoder og materialer

---

2. Prøvene ble satt til henstand ved romtemperatur i ½ time før gasskromatografisk analyse (metode 3.4.4).
3. Prøver som ikke skulle brukes med én gang ble ikke tilsatt TMS-reagens.

#### 3.4.4 Gasskromatografi

##### **Prinsipp:**

(Pedersen-Bjergaard og Rasmussen 2004)

Gasskromatografi (GC) er en separasjonsmetode for stoffer i gassform. Mobilfasen, som kalles bæregass, strømmer gjennom en oppvarmet kolonne under trykk. Det benyttes to ulike kategorier av kolonner: kapillærkolonner og pakkede kolonner. Kapillærkolonner brukes mest. Disse er laget av silika belagt med polyimid og kalles fused silika kolonner. Stasjonærfasen ligger som en tynn film på innsiden av kolonnen.

Stoffene injiseres i en oppvarmet injektor ved inngangen til kolonnen. De fordamper og bæregassen bringer dem gjennom kolonnen der de fordeler seg mellom stasjonærfase og bæregass. Stoffenes hastighet gjennom kolonnen bestemmes av deres flyktighet og løselighet i stasjonærfase, samt kolonnetemperaturen. Enkle stoffblandinger kan separeres ved konstant kolonnetemperatur, men hvis flyktigheten til stoffene varierer vil dette ta lang tid. Det er vanlig å benytte temperaturprogrammering der kolonnetemperaturen øker under analysen. Ved utgangen av kolonnen detekteres stoffene. Flammeionisasjonsdetektor (FID) er en mye brukt detektor. Den måler elektrisk strøm fra ladde partikler (ioner) som oppstår når organiske forbindelser brenner i en flamme. Det blir så skrevet ut et kromatogram.

##### **Utstyr og betingelser:**

Gasskromatograf:	Carlo Erba 6000 Vega Series 2 Programmeringsenhet: ICU 600
Integrator:	Shimadzu C-R6A
Detektor:	Flammeionisasjonsdetektor (FID) med H <sub>2</sub> og luft til flammen.
Injektor:	Splitt: splittless
Kolonne:	DB-5 (J & W Scientific)'' Fused silica'' kapillærkolonne. L: 25 m Indre diameter: 0,32 mm

### 3. Metoder og materialer

---

	Filmtykkelse: 0,25 µm			
Bæregass:	He (g)			
Flow:	Gjennom kolonnen: 1,8 ml/min			
	Splitt flow: 11 ml/min			
	Splittforhold = 1:6			
Injiseringsvolum:	1,0 µl			
Injektortemperatur:	260 °C			
Detektortemperatur:	310 °C			
Temperaturprogram:	1 °C/min	6 °C/min	30 °C/min	
	<b>140 °C</b>	<b>170 °C</b>	<b>250 °C</b>	<b>300 °C</b>

#### Prosedyre:

1. 1,0 µl av TMS-derivatisert prøve (metode 3.4.3) ble injisert.
2. Sprøyten ble vasket 3 ganger med pyridin mellom hver prøvепåsetting.
3. Programmet tok ca. 1 time.

## 3.5 Strukturoppklaring

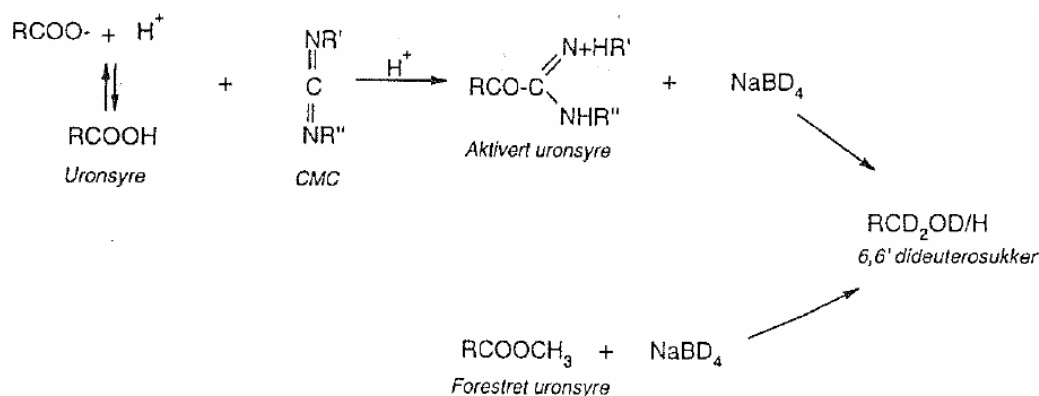
### 3.5.1 Karboksylsyreduksjon før metylering

(Kim og Carpita 1992)

#### Prinsipp:

Før metylering reduseres uronsyrenes karboksylsyregrupper for å gjøre det mulig å identifisere bindingstypene deres ved GC-MS-analyse (metode 3.5.6). Foretrede uronsyrer reduseres direkte med NaBD<sub>4</sub>, mens frie uronsyrer må aktiveres med carbodiimid (CMC) først. Det dannes 6'-6-dideuterio-sukre. Disse kan skilles fra nøytrale monosakkarider ved GC-MS-analyse på grunn av tilstedeværelse av fragmenter med molekylvekt M+2. GC-MS-analysen gir det totale antallet uronsyrer.

### 3. Metoder og materialer



**Figur 3.5:** Aktivering av frie karboksylsyregrupper i uronsyre med CMC før reduksjon. I tillegg direkte reduksjon av forestret uronsyre (Hansen 2000).

#### Reagenser:

0,2 M MES (2-[N-morfolino]etansulfonsyre), pH 4,75 (Sigma).

2 M TRIZMA (Tris[hydroksymetyl]aminometan), pH 9 (Sigma).

500 mg/ml carbodiimid (1-cykloheksyl-3-(2-morfolinoetyl)-carbodiimid-meto-p-toluensulfonat) (CMC) (aq) (Aldrich) nylaget.

100 mg/ml  $\text{NaBD}_4$  (Aldrich) i 0,05 M NaOH, nylaget.

Iseddik (Merck)

Knust is

#### Utstyr:

Rundkolbe 25 ml

Varmeskap (Heraeus)

Brand Transferpettor 50-100  $\mu\text{l}$  (Displacement Micropipette)

SMI capillaries (blå)

Whirlimixer (Fisons)

Glassutstyr ble syrevasket (metode 3.1.11)

#### Modifisert prosedyre:

1. 2 mg frysetørket prøve ble veid inn i rundkolbe og løst i 1 ml vann.
2. 200  $\mu\text{l}$  MES og 400  $\mu\text{l}$  500 mg/ml CMC ble tilsatt etterfulgt av miksing og inkubering ved 30 °C i 3 timer.
3. Prøven ble tilsatt 1 ml 2 M TRIZMA og avkjølt på is.



### 3. Metoder og materialer

---

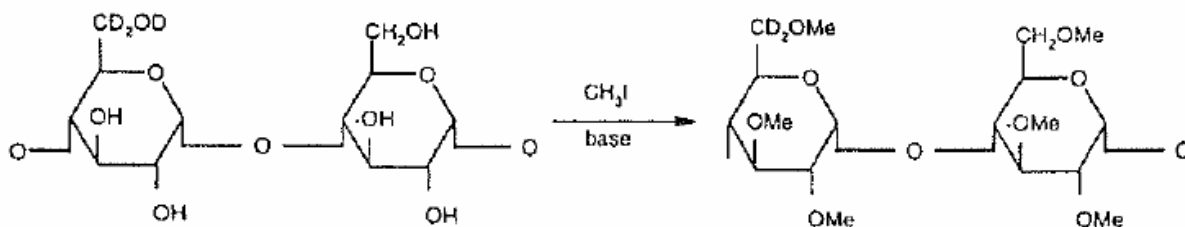
4. 1 ml 100 mg/ml NaBD<sub>4</sub> i 0,05 M NaOH ble tilsatt.
5. Løsningen ble inkubert ved 4 °C over natten.
6. 5 x 100 µl iseddik ble tilsatt for å ødelegge overskudd av reaktant.
7. Løsningen ble dampet inn til ca 1 ml og tilsatt vann opptil 2, 5 ml.
8. Salt ble fjernet fra prøven ved hjelp av en PD-10 desalting kolonne (metode 3.3.2) og prøven ble frysetørket.

#### 3.5.2 Metylering

(Ciucanu og Kerek 1984)

##### Prinsipp:

Frie hydroksylgrupper i polysakkarider deprotoneres vha dimetylsulfoksid (DMSO) og metyleres deretter ved hjelp av metyljodid i sterkt basisk miljø.



**Figur 3.6:** OH-grupper i polysakkaridet metyleres (Hansen 2000).

##### Reagenser:

Dimetylsulfoksid (DMSO) (Merck)

NaOH-pellets, tørr (Merck)

Metyljodid (CH<sub>3</sub>I) (Merck)

100 mg/ml natriumtiosulfat (aq) (Merck), nylaget.

Kloroform (prolabo)

##### Betingelser:

Sentrifugering ved 1000 G i 3 minutter.

### 3. Metoder og materialer

---

#### **Utstyr:**

Brand Transferpettor 50-100  $\mu$ l (Displacement Micropipette)

SMI Capillaries (blå)

Pasteurpipette

MS2 Minishake IKA

Ultralydblad

Morter og pistill

Metyleringsrør: glassrør med skrukork

Ristestativ: Vibrax-VXR (IKA Labortechnik)

Varmeenhet til tørking med N<sub>2</sub> (g): Reacti-Therm<sup>TM</sup> III Heating module (Pierce)

Glassutstyr ble syrevasket (metode 3.1.11).

#### **Prosedyre:**

1. Den frysetørkede prøven fra karboksylsyreduksjonen (metode 3.5.1) ble tilsatt 1 ml DMSO og ristet ved 1400 rpm i 20 minutter. Prøver som ikke løste seg ble sonikert på ultralydbad.
2. Prøven ble overført fra rundkolben til et metyleringsrør.
3. En 120 mg/ml NaOH /DMSO -suspensjon ble laget ved å rive NaOH- pellets med DMSO i mortar. Forbruket var 2 pellets/ml DMSO.
4. 500  $\mu$ l av suspensjonen ble tilsatt prøven uten å berøre glassveggene.
5. Røret ble flushet med Ar (g) og korken skrudd godt til. Deretter ble prøven ristet ved 200 rpm i 30 minutter.
6. Prøven ble tilsatt 100  $\mu$ l metyljodid og ristet ved 200 rpm i 10 minutter.
7. Punkt 6 ble gjentatt.
8. 200  $\mu$ l metyljodid ble tilsatt prøven etterfulgt av risting ved 200 rpm i 10 minutter.
9. Det ble tilsatt 10 ml 100 mg/ml natriumtiosulfat (aq) og 2 ml kloroform til prøven før miksing og sentrifugering.
10. Vannfasen (øverst) ble fjernet med pasteurpipette.
11. Kloroformfasen ble deretter vasket med 5 x 5 ml destillert vann. Det ble blandet godt og sentrifugert mellom hver vasking. Mellomfasen ble kastet.
12. Kloroformfasen ble dampet inn til tørrhet med N<sub>2</sub> (g).

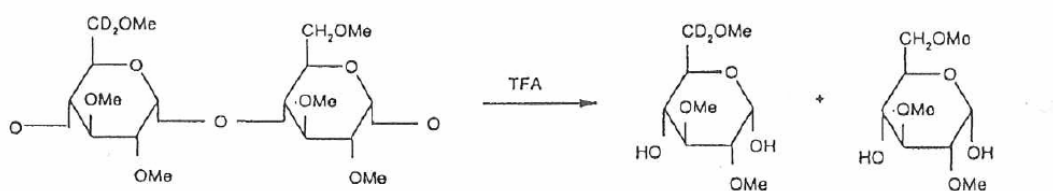
#### 3.5.3 Hydrolyse

(Kim og Carpita 1992)

##### Prinsipp:

(Cui 2005)

I surt miljø vil metylerte polysakkarider undergå hydrolyse og spaltes til delvis metylerte monsakkarider. Syrehydrolyse av polymetyleterne kløyver kun interglykosidbindinger og lar metyleterbindingene være intakte.



**Figur 3.7:** Hydrolyse av metylerte polysakkarider med TFA (Hansen 2000).

##### Reagenser:

2,5 M trifluoreddiksyre (TFA) (Merck)

##### Utstyr:

Brand Transferpettor 50-100  $\mu$ l (Displacement Micropipette)

SMI Capillaries (blå)

Varmerenhet til tørking med  $N_2$  (g): Reacti-Therm<sup>TM</sup> III Heating module (Pierce)

Varmeskap (Heraus Instruments)

##### Prosedyre:

1. 500  $\mu$ l 2,5 M TFA ble tilsatt metylert prøve (metode 3.5.2).
2. Metyleringsrøret ble flushet med  $Ar$  (g) og korken skrudd til.
3. Prøven ble inkubert i varmeskap ved 100  $^{\circ}C$  i 2 timer, deretter avkjølt og dampet inn til tørrhet under  $N_2$  (g) ved 40  $^{\circ}C$ .

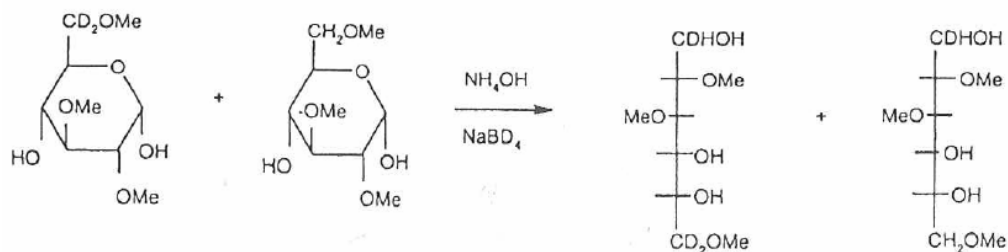
#### 3.5.4 Reduksjon

(Kim og Carpita 1992)

##### Prinsipp:

(Cui 2005)

Det sykliske hemiacetalet ved C-1 reduseres til et alditol. NaBD<sub>4</sub> introduserer deuterium på C-1, noe som gjør at man ved GC-MS kan skille mellom C-1 og C-6.



**Figur 3.8:** Reduksjon av OH-grupper ved C-1 (Hansen 2000).

##### Reagenser:

2 M NH<sub>3</sub> (Merck)

1 M NaBD<sub>4</sub> (Aldrich) i 2 M NH<sub>3</sub>, nylaget.

Iseddik (Merck)

5 % eddiksyre i MeOH

MeOH (Merck)

##### Utstyr:

Ultralydbad

Varmeskap (Heraus Instruments)

Varmeenhet til tørking med N<sub>2</sub>-gass: Reacti-Therm<sup>TM</sup> III Heating module (Pierce)

##### Prosedyre:

1. Inndampingsrest fra hydrolysen (metode 3.5.3) ble løst i 500 µl 2 M NH<sub>3</sub> og tilsatt 500 µl 1 M NaBD<sub>4</sub> i 2 M NH<sub>3</sub>.
2. Prøven ble sonikert på ultralydbad i 1 minutt før inkubering ved 60 °C i 1 time.
3. Det ble tilsatt 3 x 50 µl iseddik for å ødelegge overskudd av reduktant.

### 3. Metoder og materialer

---

4. Prøven ble dampet inn til tørrhet under N<sub>2</sub> (g).
5. 2,5 ml 5 % eddiksyre i MeOH ble tilsatt før tørking under N<sub>2</sub> (g) for å fjerne borsyre.
6. Punkt 5 ble gjentatt.
7. 2,5 ml MeOH ble tilsatt etterfulgt av tørking under N<sub>2</sub> (g).
8. Punkt 7 ble gjentatt.

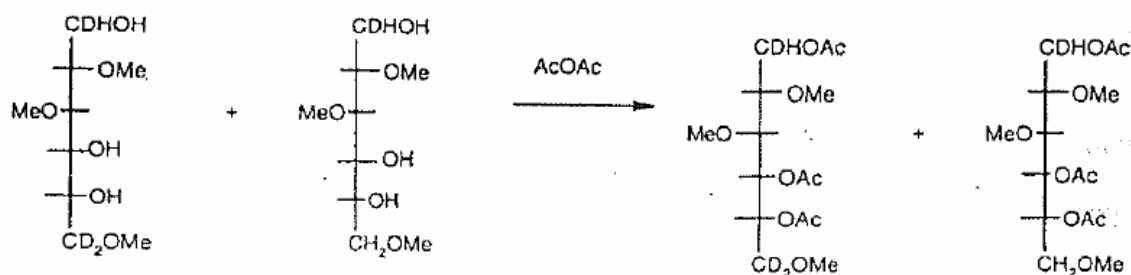
#### 3.5.5 Acetylering

(Kim og Carpita 1992)

##### Prinsipp:

(Cui 2005)

OH-grupper acetyleres med eddiksyreanhydrid. Dette gir forbindelser som er godt egnet for GC-MS-analyse (metode 3.5.6).



**Figur 3.9:** Acetylering med eddiksyreanhydrid (Hansen 2000).

##### Reagenser:

1-metylimidazol (Fluka)

Eddiksyreanhydrid (Merck)

Diklormetan (DCM) (Merck)

MeOH, vannfri (Merck)

##### Betingelser:

Sentrifugering ved 1000 G i 3 minutter.

### 3. Metoder og materialer

---

#### Utstyr:

Ultralydbad

Varmeenhet til tørking med N<sub>2</sub> (g): Reacti-Therm™ III Heating module (Pierce)

Brand Transferpettor 50-100 µl (Displacement Micropipette)

SMI Capillaries (blå)

Whirlimixer (Fisons)

Supelcorør med teflonbelagt skrukork (Supelco), 4 ml

Glassutstyr ble syrevasket (metode 3.1.11).

#### Prosedyre:

1. Inndampingsrest fra reduksjonen (fra metode 3.5.4) ble tilsatt 200 µl 1-metylimidazol og 2 ml eddiksyreanhydrid etterfulgt av miksing. Ved eventuell krystalldannelse kan prøven sonikeres på ultralydbad. Prøven ble satt til henstand ved romtemperatur i 10 minutter.
2. 10 ml vann ble tilsatt for å ødelegge overskudd av eddiksyreanhydrid. Prøven ble blandet godt og satt til henstand ved romtemperatur i 10 minutter.
3. De delvis metylerte sukrene ble ekstrahert med 2 x 1 ml diklormetan. Ved hver ekstraksjon ble det blandet godt og sentrifugert. Diklormetanfasene (nederst) ble samlet opp og slått sammen.
4. Ekstraktet ble vasket med 2 x 5 ml vann. De upolare fasene (nederst) ble samlet opp, overført til et supelcorør og tørket under N<sub>2</sub> (g).
5. Produktet ble løst i 50 µl vannfri metanol.

#### 3.5.6 GC-MS

Analysen ble utført av Finn Tønnesen ved Avdeling for Farmasøytisk Kjemi, Farmasøytisk Institutt.

#### Prinsipp:

(Cui 2005, Pedersen-Bjergaard og Rasmussen 2004)

Ved GC-MS benyttes massespektrometri sammen med gasskromatografi (metode 6.5.4).

Stoffene separeres på GC-kolonnen, og eluerer hver for seg inn i massespektrometret der de ioniseres, og helt eller delvis fragmenteres til ioner med lavere masse. Dette danner grunnlag for plotting av massespektre. Massespektrometret vil sammen med GC fungere som en avansert detektor.

### Utstyr og betingelser:

GC-MS	Fisons GC 8065 (Fisons Instruments)
GC-kolonne	SPB-1 "Fused Silica"
	Injektor: Splitt-splittless (splitt 1:10)
	Injektortemperatur: 250 °C
	Filmtykkelse: 0,25 µm
	Indre diameter: 0,25 mm
	Lengde: 30 m
Detektor	Masseselektiv detektor. Spektre tatt opp ved 70 eV.
Viktige primærioner	45, 47, 117, 118, 129, 131, 161, 162, 189, 190, 205, 207, 233, 234, 235, 261, 262, 307.
Temperaturprogram	20 °C/min      0,5 °C/min      30 °C/min <b>80 °C →→ 170 °C →→ 200 °C →→ 280 °C</b> 5 min    20 min

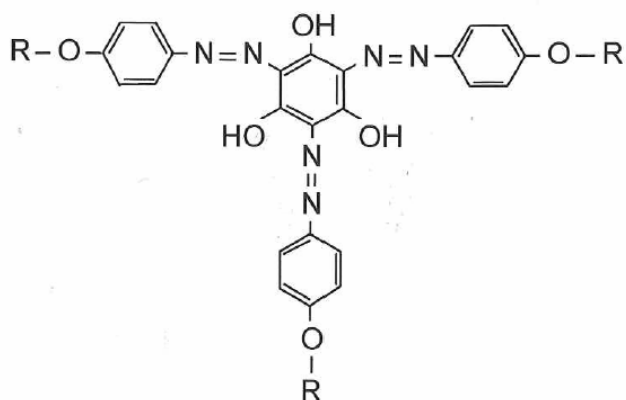
### 3.5.7 Enkel radial gel immundiffusjon

(Biosupplies Australia)

### Prinsipp:

(Krueger og van Holst 1996, van Holst 1985)

Yariv reagens er et rødt fargestoff som spesifikt binder seg til arabinogalaktaner av type II. (arabinogalaktan-proteiner, AGP). Når en prøve inneholdende AGP diffunderer ut i en gel med Yariv reagens, felles dette komplekset ut, og viser seg som en rød sirkel. Ringens diameter er proporsjonal med mengde AGP.



**Figur 3.10:** Yariv reagens.  $R =$   $\alpha$ -glukosyl,  $\alpha$ -D-galaktosyl eller  $\alpha$ -D-mannosyl (Biosupplies Australia).

#### Reagenser:

Yariv reagens: 2 mg/ml  $\alpha$ -glukosyl Yariv (Biosupplies)

Positiv kontroll: 1 mg/ml Arabisk gummi (Acacia gum) (Farmasøytisk institutt)

Ingredienser til gel med 1 med mer tykkelse:

35 mg agarose (Bio-Rad)

30 mg NaCl (s) (Prolabo)

0,7 mg  $\text{NaN}_3$  (Merck)

3,5 ml destillert vann

#### Utstyr:

Gelbondfilm for agarose (GE healthcare)

Vatret metallplate

Vakuumsug og utstansingsrør

Kar med flat bunn og lokk

Filterpapir (Whatman)

Cellepapir

Glassplate

2,5 l flaske fylt med vann

#### Prosedyre:

1. 1 mg frysetørket prøve ble løst i vann til konsentrasjon på 8 mg/ml.



### 3. Metoder og materialer

---

2. Gelbondfilm ble klippet ut etter mal, ca. 5 x 7 cm og lagt på en vatret metallplate med den hydrofile siden opp.
3. Ingredienser til gelen ble blandet, kokt opp, tilsatt 50 µl Yarivreagens og blandet på nytt.
4. Gelen ble støpt på Gelbondfilmen.
5. Etter at gelen hadde stivnet ble det laget små brønner i den ved hjelp av vakuumsug og utstansingsrør.
6. Det ble applisert 2,4 og 6 µl prøveløsning og positiv kontroll i hver sine brønner.
7. Platen ble inkubert i i 24 timer ved romtemperatur på fuktet papir i et flatbunnet kar med lokk.
8. Platen ble lagt på en glassplate og fuktet Whatman papir ble lagt over gelen.
9. Deretter ble 10 stk cellepapir brettet dobbelt og plassert over Whatman papiret.
10. En glassplate ble plassert over cellepapiret, en 2,5 liters flaske fylt med vann ble satt på dette, og platen stod til pressing i 10 minutter.
11. Cellepapiret ble snudd, og det ble presset en gang til.
12. Resultatet ble scannet.

### 3.6 Biologisk aktivitet

#### 3.6.1 Antimikrobiell aktivitet: Agardiffusjons-metode

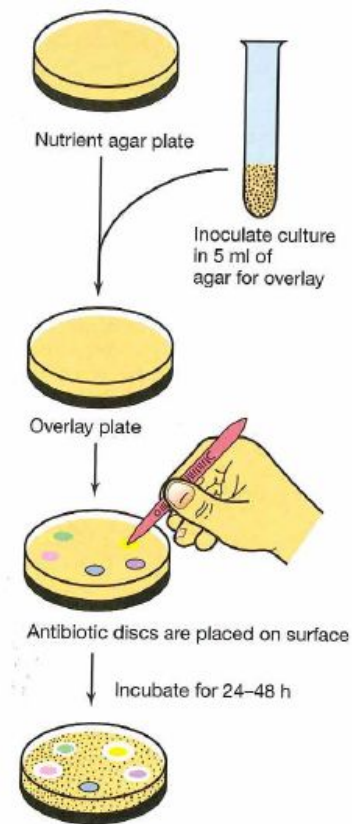
##### **Prinsipp:**

(Madigan et al. 2003)

Metoden tester antimikrobiell aktivitet. En petriskål med agarmedium inokuleres med testorganismen. Kjent mengde antimikrobiell agens appliseres på en skive av filterpapir som plasseres på agaroverflaten. Vannløselige prøver appliseres i hull i agaren. Under inkubering vil prøven diffundere utover, og jo lengre ut den diffunderer, jo lavere blir konsentrasjonen. Ved en bestemt distanse fra skiven nås MIC (minimum inhiberende konsentrasjon). Innenfor MIC vil mikroorganismenes vekst hemmes, mens de utenfor MIC vil vokse. Det dannes derfor en inhiberingssone. Sonens diameter er proporsjonal med mengde antimikrobiell agens, dens løselighet, diffusjonskoeffisient og effekt.

### 3. Metoder og materialer

---



**Figur 3.11:** Agar- diffusjons metode for testing av antimikrobiell aktivitet. Hvis mikroorganismen er sensitiv for prøven vil dette indikerers ved hemming av vekst rundt appliseringsområde (hemmingssone) etter inkubering (Madigan et al. 2003).

#### Løsninger:

1. Fysiologisk saltvann, 9 mg/ml
2. Negativ kontroll: MeOH (Merck)
3. 0,2 mg/ml gentamicin (aq) (Sigma)
4. 0,5 mg/ml sulconazol (aq) (Sigma)
5. Mc Farland standard nr 2 (Standard til å måle bakterietetthet) (Mikrobiologisk institutt)

### 3. Metoder og materialer

#### Mikroorganismer:

Art	Type	Positiv kontroll	Negativ kontroll
<i>Bacillus subtilis</i> (Remel)	Bakterie, G+	-	MeOH
<i>Kocuria rhizophilia</i> (Oxiod)	Bakterie, G+	-	MeOH
<i>Escheria coli</i> (Oxiod)	Bakterie, G-	Gentamicin	MeOH
<i>Staphylococcus aureus</i> (Remel)	Bakterie, G+	Gentamicin	MeOH
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Oxiod)	Bakterie, G-	Gentamicin	MeOH
<i>Candida albicans</i> (Oxiod)	Sopp	Sulconazol	MeOH

**Tabell 3.1:** Mikroorganismer brukt i testen. Positiv og negativ kontroll benyttet er også vist.

#### Betingelser:

Bakterier ble dyrket på M eller Hinton medium (Norges veterinærhøgskole), og sopp ble dyrket på Sabouraud medium (Norges veterinærhøgskole). All inkubering ble utført ved 37°C. Det ble benyttet aseptisk arbeidsteknikk og alt utstyr (unntatt podøser) ble før bruk satt i varmeskap ved 120 °C i 24 timer. Prøvene hadde konsentrasjon 20 mg/ml.

#### Utstyr:

Utstansingsrør, d: 0,9 cm

Målesylinder: 25 ml

Sprøyte: BD Plastic 10 ml

Reagensrør med skrukork 40 ml

Høstepinner, podøser

Flaske med kork 1 l

Syringe driven Filter Unit, 0,22µm (Millex® GP)

Filterpapir: Blank Paper Discs, 6 mm diameter (Becton, Dickinson and company)

#### Prosedyre:

1. En Oxoid culti-loop ble fuktet på en varm agarskål (37 °C) i 10-15 sekunder og mikroorganismene ble så strøket utover. Skålen ble inkubert i varmeskap (37 °C) med lokket ned. Tiden i varmeskap var 24 og 48 timer for henholdsvis bakterier og sopp.

### 3. Metoder og materialer

---

2. Fysiologisk saltvann ble sterilfiltrert (0,22 µm). Noen få kolonier med bakterier eller sopp ble skrapet av med podøse og suspendert i 2 ml fysiologisk saltvann. Tettheten av mikroorganismer ble sammenliknet med Mc Farland standard nr 2. Fra denne løsningen ble 120 µl overført til 25 ml sterilt fysiologisk saltvann og blandet godt.
3. 2 ml av inokulatet ble pipettert ut og overført til en varm agarskål (37 °C). Skålen ble vendt slik at hele overflaten ble fuktet. Overskudd inokulat ble fjernet. Skålen stod deretter med lokket delvis på i 15 minutter til overflaten var tørr.
4. Det ble laget hull i agaren med jern. 100 µl vannløselig prøve og 100 µl positiv kontroll ble pipettert ut i hullene. Filterpapir ble fuktet med 50 µl prøve løst i metanol. En lapp ble også fuktet med 50 µl negativ kontroll. Lappene ble plassert på skålen med pinsett. Skålen ble satt til henstand i romtemperatur og kjøleskap i nøyaktig 1 time for henholdsvis bakterier og sopp. Hemmingssoner ble avlest med linjal etter inkubering ved 37 °C i 24 timer (bakterier) og 48 timer (sopp).

#### 3.6.2 Komplementfikseringstest

Testen ble utført ved Nasjonalt Folkehelseinstitutt under veiledning av Terje E. Michaelsen.

##### **Prinsipp:**

(Michaelsen et al. 2000, Michaelsen 2007)

Aktivering av det terminale komplement komplekset i komplementkaskaden fører til bakteriolyse (lyse av bakterier) og hemolyse (lyse av røde blodceller). Grad av hemolyse er et mål på komplementfikserende effekt. Testen består av røde blodlegemer fra sau som sensibiliseres med antistoff fra kanin, komplementkilde (humant serum) og en testsubstans. Mange farmakologisk aktive naturstoffer kan påvirke komplementsystemet. Man sier da at de er immunmodulerende/immunstimulerende.

Komplementfiksering kan skyldes 1) forbruk av komplement, altså komplementaktivering eller 2) interaksjon med enkelte komponenter slik at disse hemmes eller inaktiveres, eller en kombinasjon av 1) og 2). Hemolysen vil følgende avta ved både aktivering og hemming, og testen skiller derfor ikke mellom disse. Aktiviteten måles ofte som laveste konsentrasjon av testsubstans som gir effekt (ICH<sub>50</sub>). En rensset pektinfraksjon (PMII) fra grodblod (*Plantago major* L) har komplementfikserende evne og brukes som standard i testen.

### 3. Metoder og materialer

---

#### Reagenser:

0,9% NaCl (aq) (Merck)

Veronal/BSA-buffer: Veronalbuffer (CFT pH 7,2) med 2 mg/ml BSA  
(Bovine Serum Albumin 30 %) og 0,02 % NaN<sub>3</sub> (aq)

Antistoff: Virion 9020 Amboceptor.

Fortynnet 1: 10 veronalbuffer

Komplementkilde: ECG 14.02.08 (humant serum)

Erytrocytter fra sau: Hvit 131, 17.01.08

Standard: PM II , 1 mg/ml (Nasjonalt Folkehelseinstitutt)

#### Utstyr:

Varmeskap med ristepate: Termax

Mikroplateleser: Thermomax

Mikotiterplater: 96 brønner: rundbunnet og flatbunnet (NUNC™  
MICROWELL PLATE/ NUNC™:NUNCLON™ surface)

Vibrax-VKR (IKA Labortechnik)

#### Prosedyre:

##### A. Vasking av saueblodceller før sensibilisering

1. En mengde saueblod ble tatt ut, 100µl per plate.
2. Blodcellene ble vasket 2 ganger med 0,9 % NaCl (aq) og 1 gang med veronal/BSA-buffer. Mellom hver vask ble blandingen sentrifugert og vaskevann fjernet.

##### B. Sensibilisering av saueblodceller

1. 15 µl Virion 9020 Amboceptor, 60 µl pakkede blodceller og 5,925 ml veronal/BSA-buffer ble inkubert med risting ved 37 °C i 30 min.
2. Blodet ble vasket 2 ganger med 0,9 % NaCl (aq) og 1 gang med veronal/BSA- buffer. Det ble sentrifugert mellom hver vask og vaskevann ble fjernet.
3. Det ble tilsatt 5,940 ml veronal/BSA buffer til blodet, og man fikk da en 1 % suspensjon av sensibiliserte blodceller (SRBC).

#### C. Titreringskurve for komplementkilden

1. 4 brønner i en rundbunnet mikrotiterplate ble tilsatt 100 µl destillert vann og 24 brønner ble tilsatt 50 µl veronal/BSA-buffer.
2. Det ble laget en fortynningsrekke av komplement og veronal/BSA-buffe, se tabell 3.2.
3. 50 µl av hver fortynning ble tilsatt brønnene med buffer (4 brønner per fortynning).
4. Platen ble dekket med bred, blank tape for å hindre fordampning, og satt på risting ved 37 ° C i 30 minutter
5. 50 µl SRBC ble tilsatt hver brønn.
6. Platen ble dekket med bred, blank tape, inkubert med risting ved 37° C i 30 minutter før sentrifugering (1400 g i 5 minutter).
7. 100 µl fra hver brønn ble overført til en flatbunnet plate. Luftbobler ble fjernet ved sentrifugering (1400 g i 5 minutter).
8. Absorbans ble målt ved 405 nm.
9. Den fortynning av komplement som ga 50 % lyseringsgrad ble brukt i testen (1:55).

Komplement:buffer	Komplement (µl)	Buffer (µl)
1:40	10	390
1:50	10	490
1:60	10	590
1:70	10	690
1:80	10	790
1:90	10	890

**Tabell 3.2:** *Titreeringskurve for komplement.*

#### D. Fortynning av prøver og standard:

1. 1 mg frysetørket prøve ble veid inn og løst i veronal/BSA-buffer til en stamløsning med konsentrasjon 1 mg/ml.
2. Det samme ble gjort med PMII.
3. Det ble laget en fortynningsrekke som vist i tabell 3.3.

### 3. Metoder og materialer

Rør	Konsentrasjon	Innhold
1	500 µg/ml	300 µl veronal/BSA buffer + 300 µl av stamløsning (1 mg/ml)
2	125 µg/ml	300 µl veronal/BSA buffer + 100 µl fra rør 1
3	31,3 µg/ml	300 µl veronal/BSA buffer + 100 µl fra rør 2
4	7,8 µg/ml	300 µl veronal/BSA buffer + 100 µl fra rør 3
5	2 µg/ml	300 µl veronal/BSA buffer + 100 µl fra rør 4
6	0,5 µg/ml	300 µl veronal/BSA buffer + 100 µl fra rør 5

**Tabell 3.3:** Fortynning av prøver og standard.

#### E. Utføring av testen

1. 50 µl av hver fortynning av prøven ble tilsatt en brønn i en rundbunnet mikrotiterplate. Det ble benyttet 2 paralleller av hver fortynning.
2. 100 µl destillert vann ble tilsatt 4 brønner (100 % lysekontroll). 50 µl veronal/BSA- buffer ble tilsatt 4 brønner (kontroll).
3. Komplement ble tint og fortynnet med veronal/BSA- buffer 1:55.
4. 50 µl av fortynningen ble tilsatt hver brønn, unntatt 100 % lysekontroll-brønnene.
5. Platen ble dekket med bred, blank tape, og satt på risting ved 37 °C i 30 minutter.
6. Hver brønn ble tilsatt 50 µl 1 % SRBC.
7. Platen ble dekket med bred, blank tape, inkubert med risting ved 37° C i 30 minutter før sentrifugering (1400 g i 5 minutter).
8. 100 µl fra hver brønn ble overført til en flatbunnet plate. Luftbobler ble fjernet ved sentrifugering (5 minutter ved 1400 g).
9. Absorbans ble målt ved 405 nm.

#### F. Beregninger

Lyseringsgraden tar høyde for komplementets egenpåvirkning og ble beregnet fra følgende formel:

$$\text{Lyseringsgrad} = [\text{Absorbans}_{\text{kontroll}} / \text{Absorbans}_{\text{vann}}] * 100 \%$$

### 3. Metoder og materialer

Prosentvis hemming fra prøvene ble beregnet fra følgende formel:

$$\% \text{-vis hemming} = [( \text{Absorbans}_{\text{kontroll}} - \text{Absorbans}_{\text{prøve}} ) / \text{Absorbans}_{\text{kontroll}}] * 100 \%$$

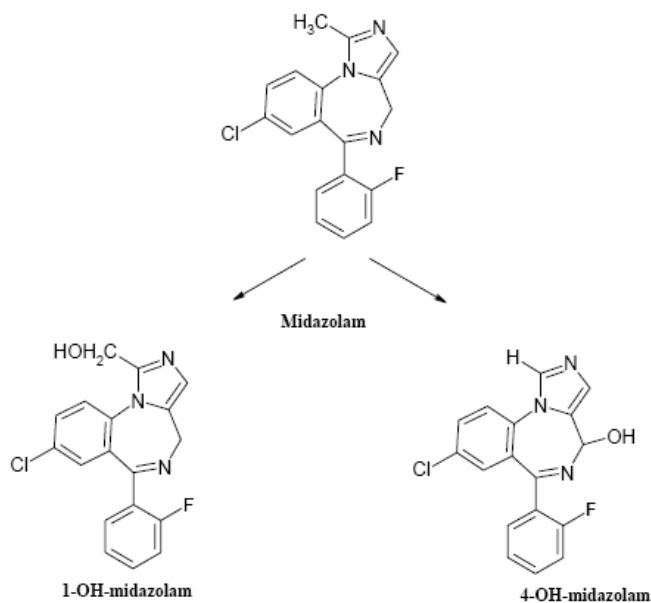
#### 3.6.3 Mikrosomforsøk med midazolam

Testen ble utført ved Avdeling for Farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk institutt, under veiledning av Hege Christensen og Siri Johannesen.

(Bakken 2006, Nikolic 2007, Postvoll 2006,)

##### Prinsipp:

Midazolam brukes ofte som CYP3A-modellsubstrat i *in vitro* og *in vivo* studier. Metabolismen av midazolam skjer nesten utelukkende av CYP3A-enzym, og metabolittene som dannes er 1-hydroksey-midazolam (1-OH-MDZ) og 4-hydroksey-midazolam (4-OH-MDZ). I denne testen studeres ulike testsubstansers hemmende effekt på isoenzymet CYP3A4. Cytokrom b5 er tilsatt fordi det er vist at denne øker hastighet av cytokrom P450-reaksjoner. En senkning i dannelse av metabolittene vil indikere at testsubstansen er en potensiell hemmer av CYP3A4.



**Figur 3.12:** Midazolam og omdanning til metabolitter. 1-OH-midazolam er hovedmetabolitt (Nikolic 2007).



### 3. Metoder og materialer

---

#### Reagenser:

Bufferløsning:

Tris-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (200 mM) pH 7,4 (Sigma- Aldrich)	130 µl/rør
MgSO <sub>4</sub> (20mM) (Sigma-Aldrich)	5,5 µl/rør
NADPH (10 mM) (Sigma- Aldrich)	35 µl/rør

Lise Madsen buffer pH 7,4:

Sukrose (Merck)	0,25 M
Hepes (Sigma-Aldrich)	10 mM
EDTA (Ferak Berlin GmbH)	2 mM

Mobilfase A: 0,05 M ammoniumformiat-buffer pH4,4

25 % NH <sub>3</sub>	4,036 ml
Konsentrert HCOOH (Riedel-de Haen)	2,125 ml
Ionebyttet vann	1 l

Mobilfase B:

95 % acetonitril (Merck)

5 % metanol (Sigma-Aldrich)

Insekt mikrosomer: Xenosomer CYP3A4 + b5 fortynnet 1:64 (16 µl + 984 µl Lise Madsen buffer) (Avdeling for Farmasøytisk biovitenskap) (BD Gentest)

Modellsubstrat: midazolam (20 µM i bufferløsning) (F. Hoffmann-La Roche Ltd.)

Intern standard: diazepam i acetonitril (4mM) (Diakonhjemmet sykehus)

Etylacetat

Acetonitril (Merck)

#### Utstyr:

Reagensglass

Knust is til avkjøling av etylacetat

Vannbad med risting (Gallenkamp)

### 3. Metoder og materialer

---

#### **HPLC/MS-apparatur og betingelser:**

Autosampler/injektor	Sil-10 AD VP
HPLC-MS	Shimadzu, Japan
Kolonne	Inertsil C8, 50 * 3 mm, partikkelstørrelse: 5 µM
Flowrate	0,5 ml/min
Injiseringsvolum	10 µl

Gradienteluering med mobilfase A og mobilfase B.

#### **Modifisert prosedyre:**

1. \* 1 mg/ml prøve løst i MeOH ble dampet inn til tørrhet med N<sub>2</sub>(g) og deretter reløst i 149 µl bufferløsning.
2. 100 µl av prøveløsningen ble overført til et reagensglass og tilsatt 22 µl midazolam før preinkubering på vannbad ved 37 °C i 5 minutter.
3. Forsøket ble initiert ved tilsetning av 50 µl mikrosomløsning (fortynnet i Lise Madsen buffer) til reagensglasset før inkubering på vannbad ved 37 °C i 7,5 minutter.
4. Proteiner ble felt og reaksjonen avsluttet ved tilsetning av iskald 220 µl etylacetat.
5. Røret ble forsiktig vippet på og vannfasen fjernet (øvre fase).
6. Punkt 4 og 5 ble gjentatt 1 gang.
7. Prøven ble dampet inn til tørrhet under N<sub>2</sub>(g).
8. Prøven ble løst i 50 µl acetonitril tilsatt intern standard og 74 µl mobilfase A. Dette ble blandet godt og overført til en vial.
9. Analyse ble utført ved HPLC-MS.
10. Det ble også laget en kontroll (uten prøve) som bestod av 149 µl bufferløsning og 22 µl midazolam. Denne ble opparbeidet på samme måte som prøven.

\* Vannløselige prøver ble løst i Tris-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> til konsentrasjon på 1 mg/ml. 100 µl prøveløsning ble tilsatt 13 µl tris-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5 µl MgSO<sub>4</sub> og 30 µl NADPH i stedet for 149 µl bufferløsning.

Videre opparbeiding var lik som for prøve løst i metanol.

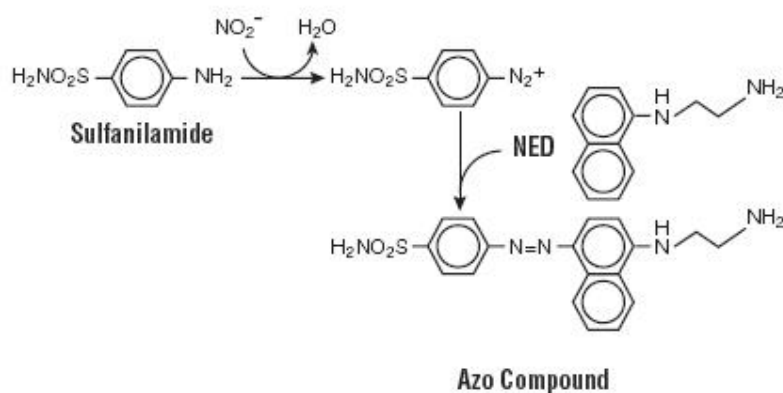
#### 3.6.4 Måling av NO-frigjøring fra makrofager

Testen ble utført av Parakashtha Ghildyal ved Avdeling for Anatomi, Rikshospitalet.

##### Prinsipp:

(Promega corporation 2005)

Aktiverte makrofager skiller ut nitrogenoksid (NO) og andre substanser som bidrar i immunresponsen. En måte å studere NO - dannelsen på er å måle mengde nitritt ( $\text{NO}_2^-$ ) som er et av to primære, stabile og ikke-flyktige nedbrytningsprodukter av NO. Griessreagens-systemet baseres seg på en kjemisk reaksjon der sulfanilamid og N-1-naptyletylendiamin dihydroklorid (NED) reagerer med  $\text{NO}_2^-$  i surt miljø, se figur 3.13. Det dannes en farget forbindelse som kan detekteres fotometrisk. Systemet kan detektere nitritt i matriks som plasma, serum, urin og cellekulturmedium.  $\text{NO}_2^-$  sensitiviteten er avhengig av matriks brukt.



**Figur 3.13:** Kjemiske reaksjoner involvert i måling av  $\text{NO}_2^-$  ved bruk av Griessreagens- systemet (Promega corporation 2005).

##### Reagenser:

Dyrkningsmedium:	RPMI 1640 tilsatt 10 % kalveserum, 1 % penicillin/streptomycin, 2 mM L-glutamin, $5 \times 10^{-5}$ M 2-mercaptoetanol.
Griess-reagens A:	1 % sulfanilamid (Sigma S-9251)
Griess-reagens B:	0,1 % N-(1-naptyl) etylendiamin (NED) (Sigma N-9125) 2,5 % fosforsyre
Cellelinje:	R2- makrofager derivert fra rottemakrofager

### 3. Metoder og materialer

---

Buffer til Coulter Counter

Isoton buffer II

Positiv kontroll:

Lipopolysakkarid (LPS)

#### Utstyr:

Celleteller

Colulter Counter

Mikrotiterplater

96 brønner med flatbunn, rundbunn og V-bunn  
(NUNC™ MICROWELL PLATE/ NUNC™: NUNCLON™  
surface)

Sentrifuge

Rotana 460 R (Beckman)

Absorbansmåler

Titerek Multiscan

Celleinkubatorskap med CO<sub>2</sub>-kontroll

#### Prosedyre:

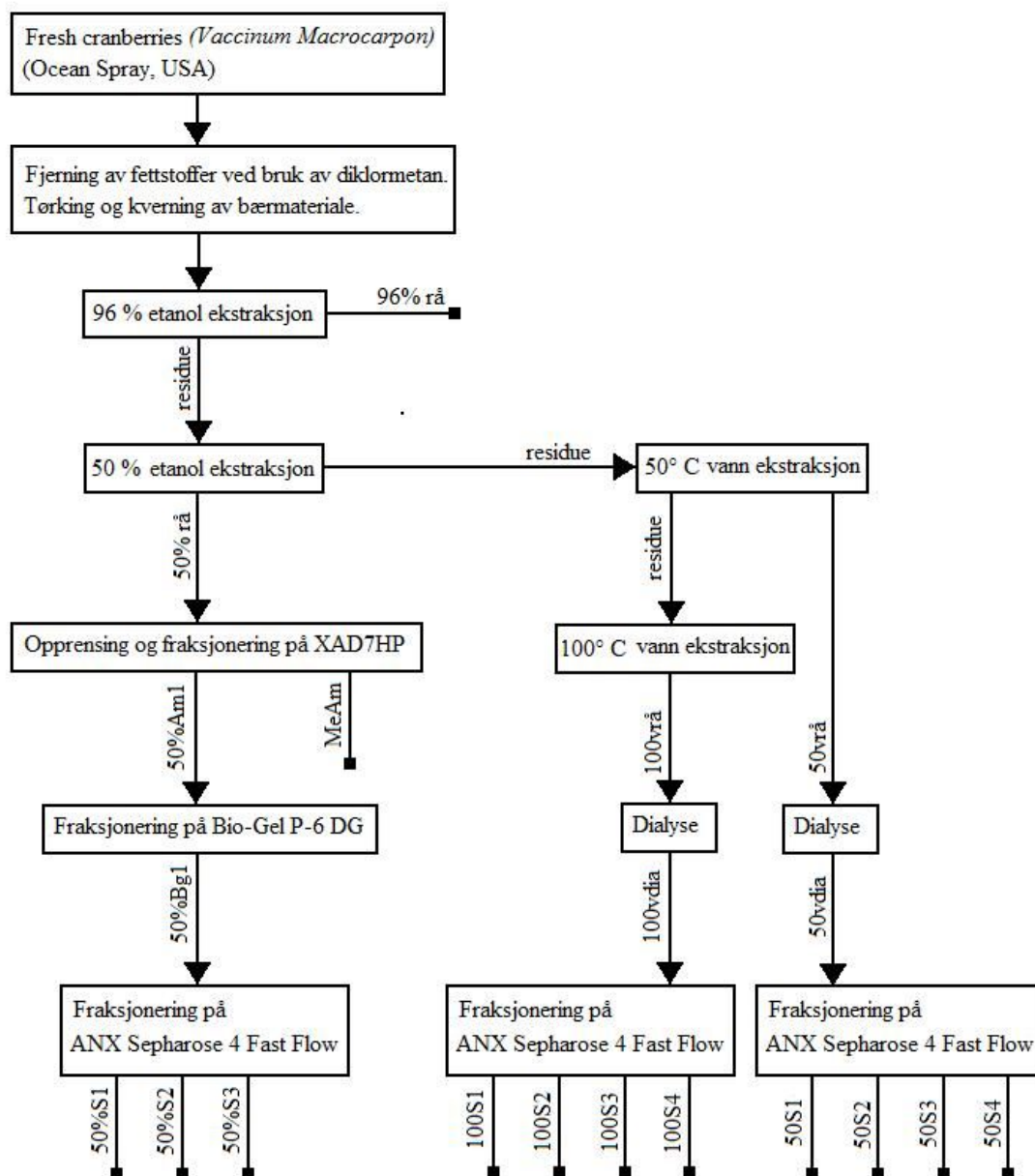
1. Makrofager ble høstet fra cellekultur.
2. 20 µl cellesuspensjon ble tilsatt 10 ml isoton buffer II, og cellene ble telt i en celleteller.
3. Cellene ble spunnet ned ved 1300 rpm i 5 minutter, deretter resuspendert til  $1 \times 10^6$  celler/ml i dyrkningsmedium.
4. 50 µl cellesuspensjon ( $5 \times 10^4$  celler) ble tilsatt hver brønn i en flatbunnet mikrotiterplate.
5. En fortynningsrekke med konsentrasjon 100 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml og 0,1 µg/ml ble laget av prøvene.
6. Det ble tilsatt 5 µl prøve til hver brønn, 2 paralleller av hver fortynning.
7. Cellene ble inkubert over natten ved 37 °C.
8. 100 µl av supernatanten ble overført til en V-bunnet mikrotiterplate og sentrifugert ved 1300 rpm i 2 minutter.
9. 50 µl av supernatanten ble overført til en rundbunnet mikrotiterplate.
10. Det ble laget en fortynningsrekke av NaNO<sub>3</sub> med konsentrasjon 100 µM, 10 µM, 5 µM, 1,25 µM og 0.
11. 50 µl Greiss A ble tilsatt hver brønn før henstand ved romtemperatur i 10 minutter på mørk sted.
12. Det ble så tilsatt 50 µl Greiss B, og absorbans ble målt ved 540 nm.

Det må lages en standardkurve for hvert assay for nøyaktig kvantifisering av NO<sub>2</sub><sup>-</sup>.

## 4. Resultater og diskusjon

#### 4.1 Ekstraksjon, opprensing og isolering av polysakkarider

### 4.1.1 Oversikt over utført arbeid



**Figur 4.1:** Flytskjema over opprensing og isolering av polysakkarider der ekstraktenes og fraksjonenes forkortelser oppgis. Fraksjoner som ikke er blitt testet for biologisk aktivitet, innhold eller struktur er utelatt.

### 4.2 Ekstraksjon av bærmateriale

#### 4.2.1 Ekstraksjon med diklormetan, 96 % etanol og 50 % etanol

Utgangsmaterialet var 3740 g bær (*V. macrocarpon*). Materialet ble først ekstrahert med diklormetan og 96 % etanol for å fjerne lavmolekylære, blant annet fenoliske forbindelser, og fettløselige substanser. Det er viktig å fjerne disse substansene fordi de kan hindre prenetasjon av vann, og dermed gi dårlig utbytte ved ekstraksjon med vandige midler (Cui 2005). Tørket og kvernet materiale ble videre ekstrahert med 96 % etanol. Residuet ble tørket og ekstrahert med 50 % etanol.

50% etanol ekstraktet dannet ved henstand en mørkerød gel. For å løse denne ble like mengder gel og destillert vann sentrifugert, og supernatant dekantert fra. Dette ble gjentatt til all gelen hadde løst seg opp, og supernatantene ble slått sammen. Ekstraktet var fortsatt svært viskøst. Det ble forsøkt å filtrere med glassfiberfilter, men filteret tettet seg. Noe av etanolen ble dampet bort, og filtreringen gikk lettere. Det lå imidlertid et viskøst lag igjen på filterpapiret, og en del polysakkarider gikk nok tapt.

Geldanningen var kraftigst i begynnelsen av ekstraksjonen. Etter hvert ble ekstraktet mindre og mindre viskøst, og det gikk å filtrere uten først å måtte fortynne gelen. Det ble likevel valgt å dampe bort etanolen, fordi filtreringen da gikk mye raskere.

Det viste seg altså at væsken ble mindre viskøs ved lavere konsentrasjon av etanol. Polysakkaridene er altså mer løselig i vann. Geldanningen kan tyde på at ekstraktet inneholder høymetoksylerte pektiner. De danner gel ved hjelp av hydrofobe interaksjoner mellom estergruppene i surt miljø eller ved tilstedeværelse av sukrose. Det ble ikke utført pH-måling av ekstraktet, men det er rimelig å anta at ekstraktet var surt, fordi *V. macrocarpon* har et høyt innhold av organiske syrer (se innledning 1.3.3). Materialet hadde imidlertid blitt ekstrahert med diklormetan og 96 % etanol, og det er usikkert hvor mye sukrose og lavmolekylære organiske syrer som var igjen i residuet. Lavmetoksylerte pektiner geler ved tilstedeværelse av polyvalente ioner, og det antas at det ikke er nok ioner tilstede til en så kraftig geldanning som ble observert.

## 4. Resultater og diskusjon

---

Et annet problem ved ekstraksjonen var at selve bærmaterialet trakk til seg etanol og svellet opp. Dette førte til at det ble svært vanskelig å dekantere ekstraktet fra materialet, og ekstraksjonen ble lite effektiv.

En løsning på problemet med at ekstraktene dannet gel kan være å benytte spesifikke pektinaser. Dette er pektindegraderende enzymer som er tilstede i alle planter og patogene bakterier og sopp. I planter har pektinasene en viktig rolle i ulike utviklingsstadier, inkludert modning av frukt. Et av disse enzymene kalles pektinesterase, og fjerner metylesterne fra de esterifiserte galakturonsyreenhetene. Bruk av disse i prøveopparbeidelsen av bærmaterialet kunne derfor senket geldanningen, men den native strukturen til polysakkaridene ville selvsagt gått tapt (Tucker og Seymour 2002).

Graden av metylesterifiseringen kan også senkes ved esterhydrolyse i surt miljø. Men lav pH vil ofte unngås fordi dette kan føre til hydrolyse av glykosidbindingene.

En annen mulighet man kan tenke seg er å øke pH i ekstraktet. For geler dannet ved interaksjon mellom  $\text{Ca}^{2+}$  og  $\text{COO}^-$  vil dette teoretisk føre til økt geldanning på grunn av høyere konsentrasjon av  $\text{COO}^-$  som kan interagere med  $\text{Ca}^{2+}$ -ioner. Høymetoksylerede pektiner er avhengig av lav pH for å danne gel, så teorisk kan en økning av pH senke geldanningen. I tillegg ville det også her skjedd en saponifisering. Dette egner seg imidlertid ikke, fordi i basisk miljø kan det skje en depolymerisering av pektinkjeden ved  $-$ eliminering. En endring av pH i ekstraktet ville dessuten ført til problemer under prøveopparbeidelsen ved separering av sure forbindelser på ionebytterkolonne (Shols og Voragen 2002).

### 4.2.2 Ekstraksjon med vann ved 50 °C og 100 °C

Etter etanolekstraksjonen ble residuet først ekstrahert med vann ved 50 °C og deretter ved 100 °C. Mellom hver ekstraksjon ble det sentrifugert og supernatanten dekantert fra. Det dannet seg ved begge ekstraksjonene gel i bunn av kolben, mest ved 50 °C vann ekstraksjonen. Det ble valgt å ikke gå videre med gelen. Det løselige ekstraktet ble filtrert. Det samme problemet oppstod ved ekstraksjon med vann ved 50 °C som ved 50 % etanol: bærmaterialet trakk til seg væske og svellet opp. Dette førte til at materialet måtte fordeles på to store kolber etter første runde med ekstraksjon. Ekstraktene fra vannekstraksjonene var begge svært viskøse.

Ekstrakt	Konsentrasjon (mg/ml)	Volum (ml)
96 % etanol	200,0	200
50 % etanol	25,0	340
50 °C vann	20,9	350
100 °C vann	28,7	300

**Tabell 4.1:** Konsentrasjon og volum av råekstrakter beregnet ut fra 50 ml frysetørket prøve.

### 4.3 Isolering og opprensing av polysakkarider

#### 4.3.1 Adsorpsjonskromatografi: Amberlite XAD7HP

50 % etanol ekstraktet var svært farget, og dette kan interferere med videre analyser. Det ble derfor valgt å rense ekstraktet ved hjelp av adsorpsjonskromatografi på en Amberlite XAD7 HP kolonne (metode 3.3.1). Metoden vil også fraksjonere ekstraktet noe.

Karbohydratprofilen ble bestemt ved hjelp av fenol-svovelsyretesten (metode 3.4.1).

Polysakkarider har større affinitet for mobilfase enn stasjonærfase, og elueres ut med vann.

Mer upolare forbindelser vil ha større affinitet for kolonnematerialet, og elueres ut med metanol, aceton: vann eller 0,1 % TFA i metanol.

25 ml 50 % rå ble applisert på kolonnen. Elueringen gikk svært sakte, høyst sannsynlig på grunn av ekstraktets viskositet. Det ble forsøkt å applisere 15 ml prøveløsning på kolonnen, men dette hjalp ikke noe særlig. Kolonnematerialet ble også ristet opp for å fordele den viskøse løsningen, og derfor forskjøv karbohydratprofilen seg noe ved hver eluering. Det ble derfor nødvendig å utføre fenol-svovelsyretesten etter hver ekstraksjonsrunde.

Måling av absorbans ble utført ved 490 nm under fenol-svovelsyretesten. Komplekser dannet fra de ulike monosakkaridene absorberer lys ved 490 nm i ulik grad. Absorbansmaksimum for heksoser er 490 nm, og for pentoser og uronsyrer 480 nm. Testen vil derfor ikke gi et helt nøyaktig kvantitativt bilde av karbohydrater tilstede (Cui 2005).



## 4. Resultater og diskusjon

---

Eluatet ble samlet opp i sentrifugerør, 10 ml per fraksjon, og ble på bakgrunn av karbohydratprofilen slått sammen til to fraksjoner, 50 % Am1 og 50%Am2. 50%Am1 var fortsatt noe farget, noe som kan tyde på 1) en overbelastning av kolonnen eller 2) at noen av de flavonoliske forbindelsene var løselig i vann og assosiert til polysakkaridene. 50%Am1 ble videre fraksjonert ved hjelp av gelfiltrering (metode 3.3.2), mens 50 % Am2 ble fryst ned. 200 ml metanoleluat ble dessuten samlet opp og frysetørket for senere senere biologisk testing.

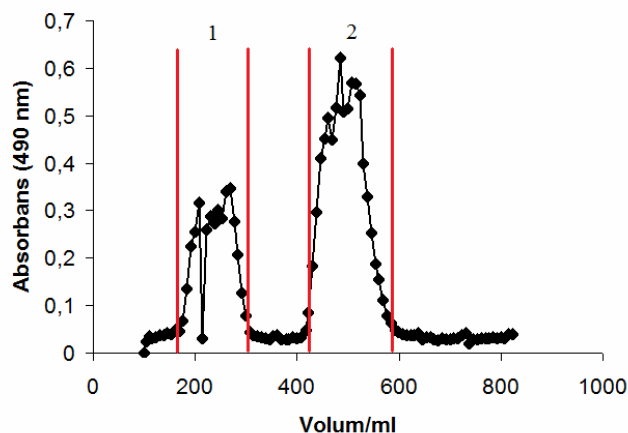
Fraksjon	Konsentrasjon (mg/ml)	Volum (ml)
50 % Am1	7,6	850
MeAm	1,0	200

**Tabell 4.2:** Konsentrasjon og volum av fraksjoner som det ble gått videre med etter opprensing av 50%rå på Amberlite XAD7HP. Konsentrasjon beregnet ut fra 50 ml frysetørket prøve.

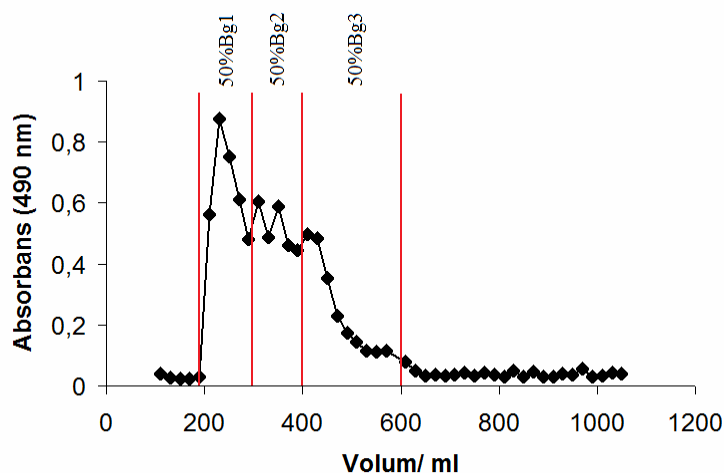
### 4.3.2 Gelkromatografi: Bio-Gel P-6 DG

Ved gelfiltrering separeres molekyler etter størrelse. Metoden benyttes her som et ledd i prøveopparbeidelsen, og brukes til å skille høymolekylære polysakkarider fra lavmolekylære forbindelser. Det ble laget en standardkurve ved bruk av dekstran (Mw: 500 000 Da) og raffinose (Mw: 600 Da) for å se når henholdsvis høymolekylære og lavmolekylære stoffer ble eluert ut. Fenol-svovelsyretest ble utført på standard- og prøveeluatet, og ved sammenlikning av disse kurvene kunne høymolekylære substanser skilles fra lavmolekylære. Eluatet ble slått sammen i 3 ulike fraksjoner, 50%Bg1, 50%Bg2 og 50%Bg3. 50 % Bg1 ble videre fraksjonert ved bruk av ionebytterkromatografi (metode 3.3.3).

#### 4. Resultater og diskusjon



**Figur 4.2.:** Karbohydratprofil av eluat til dekstran og raffinose. 1 = dekstran (Mw = 500 000 Da) 2 = raffinose (Mw = 600 Da).



**Figur 4.3:** Karbohydratprofil til 50 % Am1 etter separasjon på Bio-Gel P-6 DG. Etter sammenlikning med standardkurve ble eluatet slått sammen til 3 fraksjoner: 50%Bg1, 50%Bg2 og 50%Bg3.

Det ble også forsøkt å fraksjonere 50 °C vannekstraktet på samme måte. Det gikk imidlertid ikke å filtrere (5 µm) ekstraktet, fordi filteret tettet seg med en gang. Det ble bestemt å fortynne prøven til halvparten av opprinnelig konsentrasjon. 350 ml prøve ble tilsatt 350 ml vann. Filtringen gikk nå greit, og 100 ml prøve ble applisert på kolonnen. Væsken var fortsatt viskøs, og etter hvert tettet slangen fra kolonnen seg. Det ble derfor bestemt å ikke gelfiltrere verken 50 °C eller 100 °C vannekstraktene. De ble dialysert (metode 3.1.10) for å fjerne lavmolekylære forbindelser, før fraksjonering på ionebytterkolonne.

#### 4. Resultater og diskusjon

---

Fraksjon	Konsentrasjon (mg/ml)	Volum (ml)
50%Bgl	2,5	900
50vdia	7,0	650
100vdia	15,0	300

**Tabell 4.3:** Konsentrasjon og volum av fraksjoner som det ble gått videre med etter separasjon av 50 % AmI på Bio-Gel P-6 D. Konsentrasjon beregnet ut fra 50 ml frysetørket prøve.

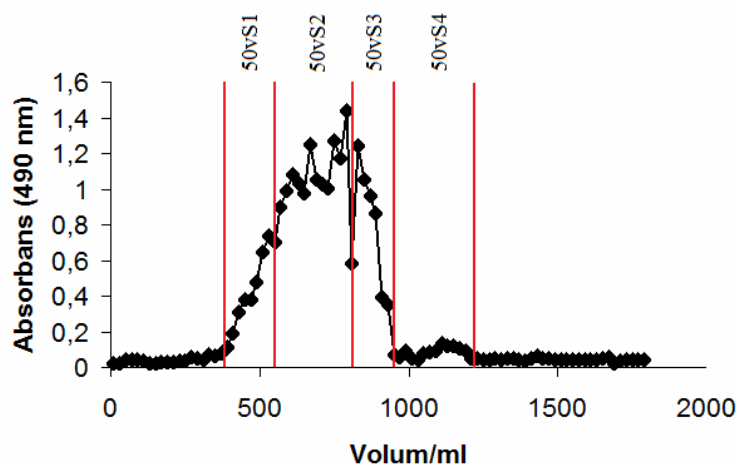
##### 4.3.3 Ionebytterkromatografi: ANX Sepharose 4 Fast Flow (high sub)

50 % Bgl, 50vdia og 100vdia ble fraksjonert ved bruk av ionebytterkromatografi (metode 3.3.3). 900 ml 50%Bgl ble tilsammen applisert på kolonnen, 450 ml hver gang. Videre ble 210 ml og 300 ml av henholdsvis 100vdia og 50vdia applisert.

Nøytrale forbindelser ble først eluert ut med destillert vann. Fraksjonen ble samlet opp og fryst ned, men ikke testet for karbohydratinnhold. Deretter ble forbindelser i prøvene eluert ut etter økende surhetsgrad med NaCl-gradient (0-2 M). Eluatet ble testet for karbohydratinnhold med fenol-svovelsyretesten og på bakgrunn av dette ble det slått sammen til 3 fraksjoner av 50 % Bgl, og 4 fraksjoner for både 50vdia og 100vdia. Til slutt ble de sureste forbindelsene eluert ut med 2 M NaCl. Denne fraksjonen ble fryst ned, men ikke testet for karbohydratinnhold. Det er imidlertid lite sannsynlig at det er karbohydrater i dette eluatet, fordi det ble ikke påvist karbohydrater etter 1,5 M NaCl ved noen av elueringene. Fraksjonene ble videre dialysert og frysetørket.

#### 4. Resultater og diskusjon

---



**Figur 4.4:** Karbohydratprofil til 50vdia etter separasjon på ionebytterkolonne. Eluatet ble slått sammen til 4 fraksjoner: 50vS1, 50vS2, 50vS3 og 50vS4.

Fraksjon	Konsentrasjon (mg/ml)	Volum (ml)
50 %S1	0,84	150
50 %S2	0,87	130
50 %S3	0,13	320
50vS1	0,42	230
50vS2	1,96	260
50vS3	1,17	150
50vS4	0,29	210
100vS1	0,54	200
100vS2	2,28	220
100vS3	1,4	210
100vS4	0,93	190

**Tabell 4.4:** Konsentrasjon og volum av fraksjoner etter fraksjonering av 50%Bgl, 50vdia og 100vdia på ionebytterkolonne.

### 4.4 Biologisk aktivitet

#### 4.4.1 Antimikrobiell aktivitet: Agardiffusjons-metode

Resistensutvikling er i dag et økende problem, og det er stort behov for nye antimikrobielle midler. Det er vist at komponenter i *V.macrocarpon* kan påvirke den antiadhesive aktiviteten til bakterier, og dermed hindre initiering av en infeksjon. Dette er særlig vist for *E.coli* (se innledning 1.3.1). Det er imidlertid få studier som bekrefter at bærene har direkte bakteriostatisk effekt, dvs. at de hemmer vekst av bakterier. Det ble her utført en agardiffusjons-prosedyre for å teste bakterie- og sopphemmende aktivitet hos noen av ekstraktene. Det ble benyttet to paralleller av MeAm og 96%rå, fordi det ble forventet at disse ville vise høyest aktivitet (Leitao et al. 2005).

<b>Ekstrakt:</b>	96 %rå	50 %rå	100vrå	50vrå	MeAm	50 %Bg1	50vdia	100vdia
<b>Løst i:</b>	metanol	vann	vann	vann	metanol	vann	vann	vann

**Tabell 4.5:** *Ekstrakter som ble testet.*

Hemmingssonens diameter beskriver minimum inhiberende konsentrasjon. Jo større diameter, jo lavere konsentrasjon av prøven kreves for bakteriostatisk effekt.

#### 4. Resultater og diskusjon

Ekstrakt	Mikroorganisme	Hemmingssone (diameter)		Hemmingssone til positiv kontroll (diameter)	
		Parallell I	Parallell II	Parallell I	Parallell II
50 %rå	<i>K.rhizophilia</i>	1,3 cm	-	-	-
MeAm	<i>K.rhizophilia</i>	0,9 cm	1,1 cm	-	-
MeAm	<i>B.subtilus</i>	1 cm	1 cm	-	-
	<i>E.coli</i>	-	-	2,8 cm	2,8 cm
50%rå	<i>S.aureus</i>	1,2 cm	-	2,9 cm	2,9 cm
MeAm	<i>S.aureus</i>	0,9 cm	0,9 cm	2,9 cm	2,9 cm
96%rå	<i>P. aeruginosa</i>	3 cm	3 cm	2,5 cm	2,5 cm
MeAm	<i>P. aeruginosa</i>	0,9 cm	0,9 cm	2,5 cm	2,5 cm
50%rå	<i>P. aeruginosa</i>	0,8 cm	-	2,5 cm	2,5 cm
50%rå	<i>C.albicans</i>	0,9 cm	-	2,3 cm	2,2 cm

**Tabell 4.6:** Oversikt over de prøver og mikroorganismer som viste hemmet vekst. Hemmingssone til positiv kontroll er også vist.

Det viste seg altså at 50 %rå og MeAm hadde størst bakteriostatisk effekt. De hemmet begge vekst av *K.rhizophilia*, *S.aureus* og *P. aeruginosa*. I tillegg hemmet MeAm veksten av *B.subtilus* og 50%rå hemmet vekst av *C.albicans*. I testen ble det på grunn av en feil ikke benyttet positiv kontroll for *K.rhizophilia* og *B.subtilus*. Man får derfor ikke noe å sammenlikne hemmingssonen med, og det må utføres flere forsøk før man kan si med sikkerhet at disse gir hemming av bakterienes vekst. Det er likevel sannsynlig at resultatet stemmer, fordi de to ekstraktene hemmet vekst av flere mikroorganismer i testen. Verken 50%rå eller MeAm hadde i noen av tilfellene bedre effekt enn positiv kontroll der det ble brukt. Men så består ekstraktene av flere komponenter og er ikke renfremstilte enkeltkomponenter slik som kontrollsubstansene

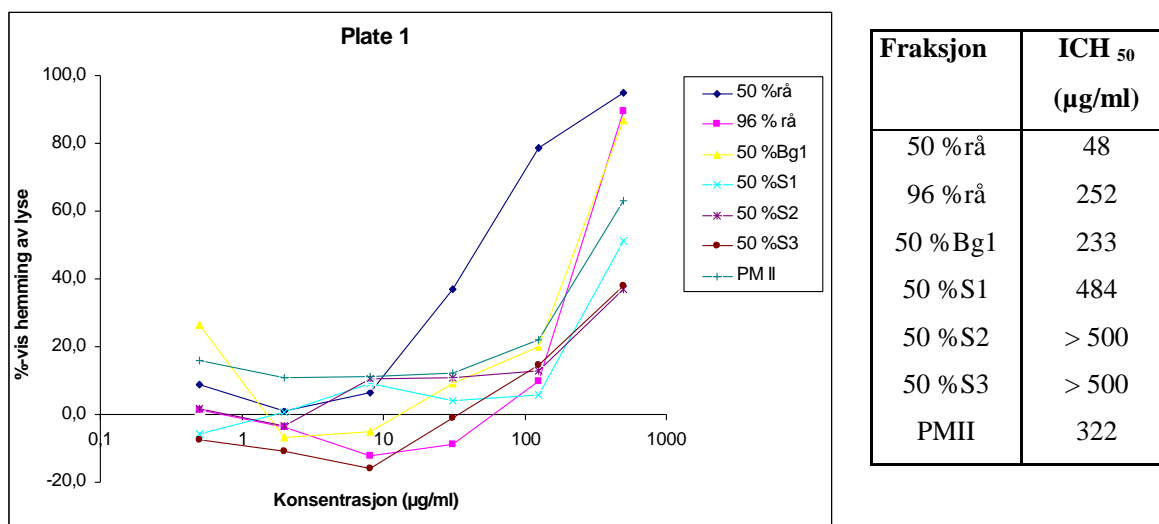
96%rå viste kun aktivitet mot *P. aeruginosa*. Til gjengjeld var hemmingssonens diameter større enn hos den positive kontrollen. Ingen av vannekstraktene eller 50%Bgl ga utslag i testen. Dette indikerer at aktiviteten kan tillegges lavmolekylære komponenter i bærene.

## 4. Resultater og diskusjon

*E.coli* var den eneste mikroorganismen som ikke ble påvirket av noen av prøvene. Dette støtter opp om studier som har vist at *V.macrocarpon* ikke vil være effektiv i selve behandlingen av en urinveisinfeksjon (se innledning 1.3.1). Resultatene indikerer videre at komponenter i amerikansk tranebær kan ha potensiale som bakterie- og sopphemmende midler, men det må gjøres flere studier før man kan si noe sikkert. Det må benyttes flere paralleller for alle prøver som testes.

### 4.4.2 Komplementfikseringstest

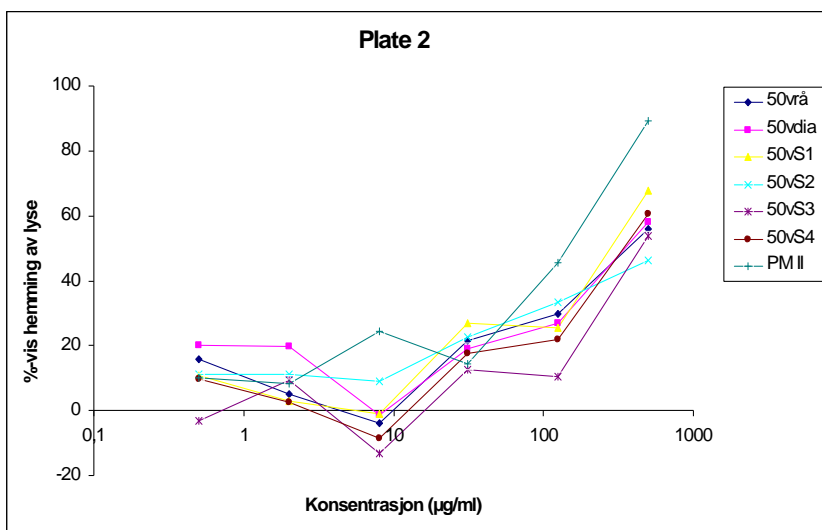
De ulike fraksjonenes evne til å påvirke komplementsystemet ble testet, og PMII ble brukt som standard (metode 3.6.2). Testen skiller ikke mellom aktivering og hemming av komplementsystemet, fordi i begge tilfellene vil komplement forbrukes.  $ICH_{50}$  ble beregnet for alle fraksjonene.  $ICH_{50}$  angir laveste konsentrasjon prøve som gir 50 % hemming av lyse. Jo lavere  $ICH_{50}$ -verdi, jo høyere aktivitet har prøven.  $ICH_{50}$  kan brukes til å sammenlikne de ulike fraksjonenes aktivitet. Det må utvises forsiktighet ved sammenlikning av prøver fra ulike plater, fordi betingelsene alltid vil variere noe. Ved å relatere prøvens aktivitetsmodulering til PMII kan man likevel få en indikasjon på hvilke prøver som har høyest aktivitet.



**Figur 4.5:** Komplementfikserende aktivitet og tilhørende  $ICH_{50}$ -verdier til prøver og PMII på plate 1.

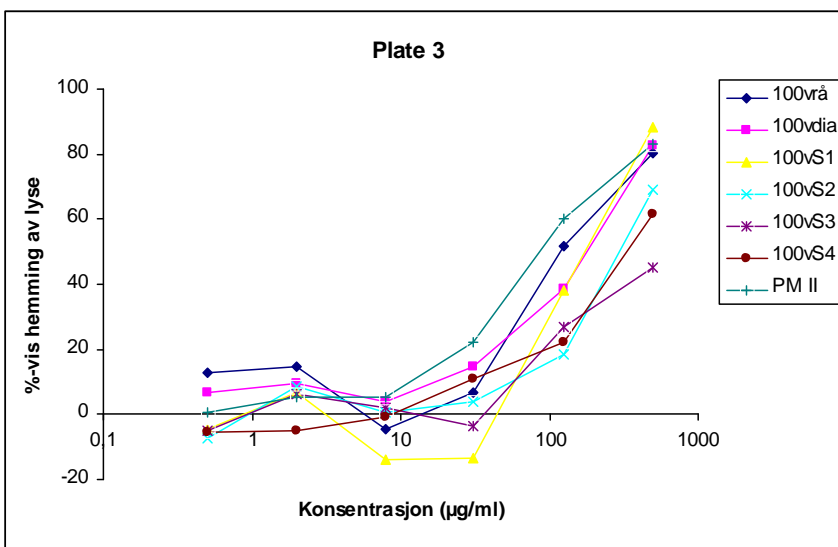
#### 4. Resultater og diskusjon

På plate 1 viste 50 %rå, 50%Bg1 og 96%rå høyest aktivitet.  $ICH_{50}$  for 50 %S2 og 50%S3 kunne ikke bestemmes, fordi konsentrasjon brukt ikke var høy nok til å gi 50 % hemming av lyse. Aktiviteten var lavest i de opprensede fraksjonene av 50 % etanol ekstraktet, der de sure polysakkaridfraksjonene viste lavest komplementmodulerende effekt. Denne sank parallelt med polysakkaridenes økende surhetsgrad.



Fraksjon	$ICH_{50}$ (µg/ml)
50vrå	362,1
50vdia	349,6
50vS1	279,4
50vS2	> 500
50vS3	443
50vS4	342
PMII	144

**Figur 4.6:** Komplementfikserende aktivitet og tilhørende  $ICH_{50}$ -verdier til prøver og PMII testet på plate 2.



Fraksjon	$ICH_{50}$ (µg/ml)
100vrå	118,2
100vdia	179,7
100vS1	173,9
100vS2	297,4
100vS3	> 500
100vS4	332,6
PMII	86,3

**Figur 4.7:** Komplementfikserende aktivitet og tilhørende  $ICH_{50}$ -verdier til prøver og PMII testet på Plate 3.



På plate 2 og 3 ble det sett like tendenser. Det så ikke ut til at en opprensing av rækstraktene hadde noen særlig betydning for aktiviteten. Ingen av fraksjonene viste høyere aktivitet enn PMII. 50vS2 og 100 vS3 viste ikke 50 % hemming av lyse, og  $ICH_{50}$  ble derfor ikke bestemt. Av de opprensede fraksjonene hadde 50vS1 og 100vS1 høyest aktivitet på sine respektive plater, og den komplementmodulerende evnen avtok i begge tilfeller med polysakkaridenes økende surhetsgrad.

Sammenlikning av aktivitet i forhold til PMII viser at 50%rå, 96%rå og 50%Bgl har høyest komplementmodulerende effekt. Dette var de eneste fraksjonene i testen som viste høyere aktivitet enn PMII. Dette kan tyde på at aktiviteten ikke skyldes polysakkarider, eller at de aktive polysakkaridelementene inngår i geldannelse, og derfor ikke elueres ut av kolonnen(e) under prøveopparbeidelsen. En annen forklaring kan være at polysakkaridene ikke har løst seg i løsningsmidlet benyttet i forsøket. Pektinkjedene kan være så intramolekylært tettpakket at de ikke har mulighet til å interagere med komplement. Dette blir kun spekulasjoner.

Det ble bestemt å utføre strukturoppklaring av 50 %S1, 50vS1 og 100vS1, fordi disse viste høyest aktivitet av de sure fraksjonene. Videre ble det valgt å strukturoppklare 50%rå, fordi den hadde såpass høy aktivitet sammenliknet med de andre prøvene. Det er ikke vanlig å utføre metyleringsanalyse av rækstrakter.

### 4.4.3 Mikrosomforsøk med midazolam

Dette forsøket var et pilotforsøk. Prosedyren har nemlig ikke blitt benyttet til testing av prøver som inneholder karbohydrater. Tidligere har det blitt vist at sukrose i Lise Madsen bufferen (se metode 3.6.3) karameliserte ved injisering i HPLC-MS. Dette problemet ble det funnet en løsning på, for det er ikke ønskelig å injisere karbohydrater i dette systemet. Vanlig prosedyre er å benytte iskald acetonitril for å avslutte reaksjonen mellom mikrosomene og prøveløsning. Det ble nå i stedet benyttet iskald etylacetat for å felle proteinene. Ved tilsetning av etylacetat til den vandige løsningen med prøve og mikrosomer vil det dannes to faser: en polar og en upolar. Proteiner og sukre vil løse seg i vannfasen, mens metabolitter og intern standard løses i etylacetat. Vannfasen som inneholder proteiner og sukre kan da fjernes. Den upolare fasen

#### 4. Resultater og diskusjon

inneholdende metabolitter og intern standard dampes inn til tørrhet under N<sub>2</sub> (g), løses i acetonitril og analyseres i HPLC-MS-systemet.

Amerikanske tranebær benyttes i utstrakt grad, og det er derfor viktig å vite om de kan interagere med legemidler. Dette gjelder særlig for legemidler med et smalt terapeutisk vindu, der en interaksjon kan få alvorlige følger. En økning i serumkonsentrasjon kan føre til økt effekt og dermed bivirkninger, mens en senkning vil gi nedsatt effekt av legemidlet. I denne testen ble ulike fraksjoners hemmende effekt på CYP3A4 mediert metabolisme testet. Den %-vise hemmingen av metabolisme ble beregnet på følgende måte, der i.s. = intern standard og kontroll består av 149 µl bufferløsning og 22 µl midazolam:

$$(\text{topphøyde}_{\text{metabolitt i kontroll}} / \text{topphøyde}_{\text{i.s.}}) - (\text{topphøyde}_{\text{metabolitt i prøve}} / \text{topphøyde}_{\text{i.s.}}) * 100\%$$

Fraksjoner	Løst i	%-vis hemming av 1-OH- MDZ	%-vis hemming av 4-OH-MDZ
96 % rå	Metanol	73	87
MeAm	Metanol	100	100
50% rå	Buffer	100	100
50vrå	Buffer	Stimulerer	Stimulerer
100vrå	Buffer	Stimulerer	Stimulerer
50%Bgl	Buffer	Stimulerer	Stimulerer

**Tabell 4.7:** Ekstrakter og fraksjoner testet og deres hemming/stimulering.

96 % rå hemmer metabolismen med 73 og 87 % for henholdsvis 1-OH og 4-OH midazolam. Det ble ikke identifisert topper av 1-OH-MDZ og 4-OH-MDZ i MS-spekteret for prøver som inneholdt MeAm eller 50%rå. Dette kan tyde på at disse gir fullstendig hemming. Det kan imidlertid ikke påvises at hemmingen er fullstendig, og det kan derfor kun konkluderes med at den nærmer seg 100 %.

50vrå, 100vrå og 50%Bgl viste en stimulering av systemet. Det vil si at det ble dannet mer av metabolittene i disse prøvene enn i kontrollen. Dette kan ikke tilskrives en endret gentranskripsjon og oppregulering av enzymene, fordi systemet som brukes ikke er komplekst nok til dette. Dessuten ville ikke inkuberingstiden av prøve med enzym være lang nok til en slik prosess. En mulig forklaring på fraksjonenes stimulering er at høymolekylære

## 4. Resultater og diskusjon

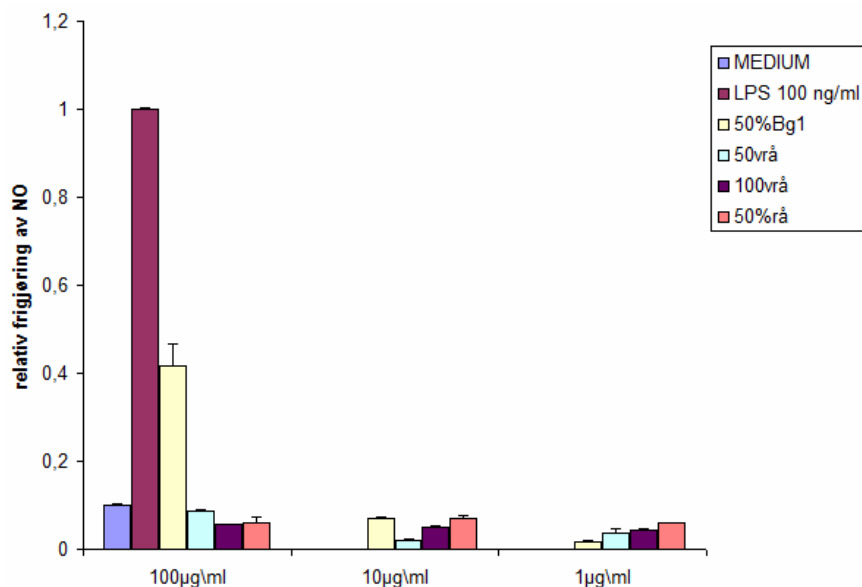
forbindelser fysisk hindrer enzymet i å interagere med midazolam. Effekten kan altså være allosterisk (Christensen 2008).

Studier utført på amerikanske tranebær har vist sprikende resultater i forhold til hemming av CYP-enzym. Det er vist at komponenter i amerikanske tranebær kan hemme enzymer *in vitro*, men humane *in vivo* studier støtter ikke opp om resultatene (se innledning 1.3.2). Det er derfor ikke sikkert at resultatene funnet her kan relateres til hva som vil skje i kroppen. Imidlertid er det ikke tidligere utført CYP-interaksjonsstudier på høymolekylære fraksjoner fra *V.macrocarpon* slik det er blitt gjort her. En årsak til at *in vivo* studier ikke samsvarer med *in vitro* studiene kan være at stimuleringen til de høymolekylære forbindelsene opphever den hemmende effekten til andre forbindelser. Dette bør utføres flere studier på dette.

### 4.4.4 Måling av NO-frigjøring fra makrofager

Testen ble i sin helhet utført av Parakashtha Ghildyal, Avdeling for Anatomi, Rikshospitalet.

Når makrofager aktiveres skiller de ut NO som raskt brytes ned til nitritt. I denne testen ble det målt hvor mye nitritt som ble dannet når 50%Bg1, 50vrå, 100vrå og 50%rå ble inkubert med makrofager og deretter tilsatt Griess-reagenser. Hvis NO og videre nitritt er tilstede, vil det ved tilsetning av Griess-reagens A og B bli dannet et farget kompleks. Dette kan bestemmes fotometrisk. LPS benyttes som positiv kontroll. Medium er negativ kontroll.



**Figur 4.8:** Måling av NO frigjøring fra makrofager etter inkubering med 50%Bg1, 50vrå, 100vrå og 50%rå. LPS er positiv kontroll. Medium er negativ kontroll.

Det er tidligere vist at polysakkaridekstrakter fra planter har evne til å aktivere makrofager (Paulsen og Barsett 2005). Her ble det imidlertid vist at verken 50vrå, 100vrå eller 50%rå inneholdt komponenter som kunne føre til en aktivering. Kun 50%Bgl viste en aktivitet der det var sammenheng mellom dose og respons. Dette var også den mest opprensede fraksjonen. Ved sammenlikning med komplementtest resultatene ser man at 50%Bgl var mer aktiv enn 100vrå og 50vrå. 50%rå var imidlertid mer aktiv enn 50%Bgl. Dette indikerer at forbindelser ekstrahert ut i 50 % etanol ekstraktet har større påvirkning på immunsystemet enn forbindelser i 50 °C og 100 °C vannekstraktene.

### 4.5 Kvalitativ og kvantitativ bestemmelse av karbohydratinnhold

#### 4.5.1 Monosakkaridbestemmelse

Det ble utført kvantitativ og kvalitativ analyse av monosakkaridinnhold i alle ekstrakter og fraksjoner. Dette ble gjort ved hjelp av metanolyse, TMS-derivatisering og etterfølgende gasskromatografisk analyse (metode 3.4.2-3.4.4).

Ved GC-analyse gir hvert monosakkarid et karakteristisk mønster av topper. Ved å sammenlikne kromatogrammet med mønstre og retensjonstider for standardkurver kan monosakkaridene identifiseres. Mengde monosakkarid bestemmes ved hjelp av arealet under kurven til den høyeste toppen i mønsteret. Dette relateres til arealet av intern standard, som tilsettes for å korrigere for eventuelle tap under prøveopparbeidelsen og variasjon ved injisering. Den prosentvise fordelingen av de ulike monosakkaridene er vist i tabell 4.8.

#### 4. Resultater og diskusjon

Fraksjon	Ara	Rha	Fuc	Xyl	Man	Gal	Glc	GalA	4-OH-Me-GlcA	% av total karbohydrat i prøvematerialet
96 % rå	0,8	0,9	0	0	0	1	97,3	0	0	93,1
50 %rå	21,9	3,9	0	5	2,2	13,7	14,7	32,3	6,3	57,9
50 %Am1	14,1	4,1	0	4	2,6	16	15,3	35,7	8,8	51,4
MeAm	43	2,3	0	3	1,3	8,1	19,1	13,3	10,4	45,7
50 %Bg1	21,6	6,4	0	1	2,4	22	0,4	45,8	0,6	96,3
50 %S1	8,8	4,1	0	0	0,4	9	5,3	72,5	0	35,5
50 %S2	14,3	0,7	4	5	0,2	10	0,8	64,6	0	81,7
50 %S3	12,6	6,5	5,5	0	0	11	1,6	62,5	0	73,5
50vrå	15,5	3,6	0	9	1,1	8	11,7	50,9	0,4	70,8
50vdia	13,9	3,1	0	7	1,7	8,4	12,1	51,1	2,3	78,3
50vS1	6,2	0,5	0	10	1,5	5,9	24,3	51,5	0	53,5
50vS2	15,1	5	0	1	0,6	9,2	3,9	65	0	76
50vS3	13,4	3,9	0	2	0,1	10	5,9	64,6	0	46,3
100vrå	37	6,2	3,7	2,2	3,3	13,3	8,4	26	0	100
100vdia	41,1	7,5	0	5	4,1	16	9,2	15,2	0,4	90,3
100vS1	29,5	2,3	0	11	4,2	11	21,3	20,7	0	100
100vS2	24,5	7,5	0	3	3,8	17	6,8	36,7	1,1	83,5
100vS3	27,3	10,1	0	1	0,2	15	2,4	42,6	0	100
100vS4	24,6	8,7	0	1	0,4	16	3,8	44,8	0	89,9

**Tabell 4.8:** Prosentvis fordeling av monosakkarider i forhold til total mengde sukker. Prøvens prosentvise innhold av karbohydrat i forhold til innveid mengde prøve er også vist.

Analysen viser at alle ekstrakter og opprensede fraksjoner, unntatt 96%rå, inneholder relativt mye galakturonsyre, arabinose og galaktose. Det er lite fukose og mannose tilstede. Innhold av GalA er større i 50%S1 enn 50%S2, noe som kan skyldes en høy metylforestringsgrad av uronsyrene. Dette er ikke tilfelle for ionebytterfraksjonene for 50 °C og 100 °C vannekstraktene. Det høye innholdet av GalA i alle fraksjonene og ekstraktene, unntatt 96%rå, korrelerer godt med de geldannende egenskapene som flere av disse har vist.

Metanolekstraktet inneholder også GalA. En mulig forklaring på dette kan være at noen galakturonsyrer er så høyt forestret at de opptre som nøytrale forbindelser. Ingen av de

#### 4. Resultater og diskusjon

---

nøytrale fraksjonene etter ionebytteeuering ble imidlertid testet for karbohydratinnhold, så dette kan man ikke si sikkert.

Tilstedeværelse av glukose i opprensede fraksjoner tyder ofte på forurensning av prøven, men hvis innholdet er høyt kan dette indikere en faktisk tilstedeværelse av polysakkarider med glukose.

50%Bg1 består hovedsakelig av halvparten arabinose og og galaktose, og den resterende halvparten av galakturonsyre. De opprensede sure fraksjonene har ikke dette forholdet. Det kan derfor tyde på at en del polysakkarider har gått tapt under fraksjonering på ionebytter, høyst sannsynlig på grunn av geldanning.

### 4.6 Strukturoppklaring

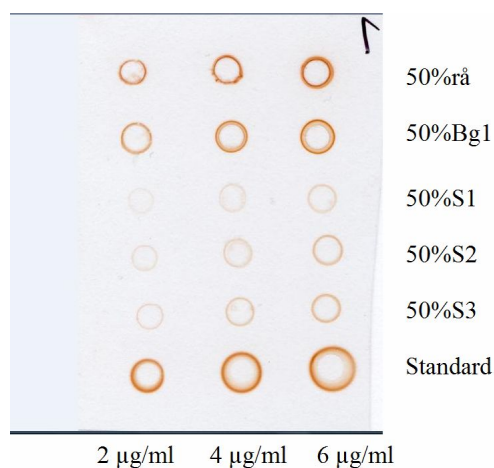
#### 4.6.1 Påvisning av arabinogalaktanproteiner

Det ble utført Yarivtest (metode 3.5.7) for å sjekke de ulike ekstrakter og fraksjoners innhold av arabinogalaktanproteiner. Det ble i alt testet 4 plater, og tabell 4.9 viser resultatene. Figur 4.9 viser en av gelplatene i testen.

Ekstrakt/ fraksjon	Resultat
50 %rå	++
50 %Bg1	++
50 %S1	+
50 %S2	+
50 %S3	+
100vrå	+
100vdia	+
100vS1	-
100vS2	+
100vS3	+
100vS4	+
50vrå	+
50vdia	+
50vS1	+
50vS2	+
50vS3	+
50vS4	+

**Tabell 4.9:** Fraksjoner og resultat fra enkel radial gel immunodiffusjon. (++) = tydelig utslag, (+) = svakt utslag, (-) = ikke utslag.

## 4. Resultater og diskusjon



**Figur 4.9:** En av gelplatene i testen. Røde ringer indikerer at prøver og standard har felt ut med Yariv-reagens.

Bare 50%rå og 50%Bg1 viste tydelig positivt utslag i testen, indikert av sterke røde ringer rundt brønnene med prøve. De andre fraksjonene ga kun svake fargede ringer, men også dette indikerer at de inneholder noe AGP. 100Sv1 var den eneste fraksjonen som ikke ga utslag i testen. Resultatet korrelerer godt med resultat fra komplementfikseringstesten. Det ble nemlig vist at 50%rå og 50%Bg1 hadde høyest komplementmodulerende effekt, og det er tidligere vist at polysakkarider med AG-II ofte er aktive i komplementfikseringstesten.

Ut fra monosakkaridsammensetningen bestemt ved metanolyse, TMS-derivatisering og GC-analyse ser man at alle fraksjonene inneholder arabinose og galaktose, men mye mindre i forhold til galakturonsyre, eksempelvis 50%rå og 50%Bg1. Hos de fraksjoner som viste lite/svakt utslag i Yariv-testen kan det være at være at arabinose og galaktose har en annen struktur enn AG-II.

### 4.6.2 Bestemmelse av bindingsforhold

Som følge av resultater i komplementfikseringstesten ble det bestemt å analysere bindingsforholdene i 50%rå, 50%S1, 50vS1 og 100vS1. Det er ikke vanlig å utføre en slik analyse på råekstrakter. Det er tidligere ikke utført strukturstudier på polare, høymolekylære substanser fra *V. macrocarpon*.

Bindingsforhold ble bestemt etter karboksylsyre-reduksjon, metylering, hydrolyse, reduksjon, acetylering og etterfølgende GC-MS-analyse (metode 3.5.1- 3.5.6). Hver bindingstype for et bestemt monosakkarid gir opphav til en topp i MS-kromatogrammet. Ved sammenlikning av



#### 4. Resultater og diskusjon

---

retensjonstid og fragmenteringsmønstre med kjente standarder identifiseres monosakkaridenheter og deres bindingstype. Areal under kurven brukes til kvantifisering, der verdien korreleres til metanolyseresultatene. Resultatet er vist i tabell 4.10.

#### 4. Resultater og diskusjon

	Bindingstype	50%rå	50%S1	50vS1	100vS1
Ara					
	Tf	15,4	8,8	4,8	10,7
	1 2f ,1 3f	6,5		0,6	2,5
	1 4 <sub>p</sub> eller 1 5 <sub>f</sub>			0,8	12,4
	1 3,5 <sub>f</sub> eller 1 3,4 <sub>p</sub>				3,6
	1 2,5 <sub>f</sub> eller 1 2,4 <sub>p</sub>				0,3
Xyl					
	Tp			3,8	2,6
	1 4p			6,2	6,9
	1 2,4 p				1,6
Rha					
	1 2			0,5	
Glc					
	Tp	14,7			1,6
	1 4			19,1	19,7
	1 4,6			5,20	
Gal					
	1 4			1,8	
	1 3			0,5	
	1 3,6			3,6	
GalA					
	Tp	32,3		6,2	
	1 4			45,3	
GlcA/4-OH-Me-GalA	Tp	6,3			Spor

**Tabell 4.10:** Oversikt over den prosentvise fordelingen av monosakkaridenes bindingsforhold i 50%rå, 50%S1, 50vS1 og 50vS2. f = furanoseform, p = pyranoseform.

Det ble vist overraskende lite resultater i denne strukturanalysen. Det mangelfulle resultatet kan skyldes løselighetsproblemer, manglende reduksjon eller hydrolyse, eller en kombinasjon av disse:

### **Løselighetsproblemer**

I 50%S1 ble kun terminalt bundet arabinose identifisert. En årsak til dette kan være at da det frysetørkede materialet ble løst i DMSO under metyleringsprosessen (metode 3.5.2) dannet det seg en gelklump i bunn av rundkolben. Prøven ble ristet ved 1400 rpm i flere timer og også sonikert på ultralydbad. Sonikeringen gjorde bare geldannelsen større. Dette førte til at bare noe av prøveløsningen kunne tas med videre. De andre prøvene viste også dårlig løselighet i DMSO, men dette ble noe bedre etter sonikering på ultralydbad. Mest sannsynlig er det den dårlige løseligheten som førte til det mangelfulle resultatet for 50%rå og 50%S1.

I 50% etanol råkstraktet var det dessuten mange forskjellige typer forbindelser. På avdelingen er det lite erfaring med hvordan fenoliske forbindelser kan virke inn i denne analysen.

### **Manglende reduksjon**

Ved karboksylsyre-reduksjonen (metode 3.5.1) ble ikke de forestrede karboksylsyregruppene redusert direkte med NaBD<sub>4</sub> før aktivering og redusering av de frie syregruppene. Grunnen til dette var at det i tidligere studier hadde blitt vist at det totale antall uronsyrer likevel ikke ville avvike noe særlig fra resultat ved forsøk som inkluderte det første trinnet (Paulsen 2008). I 100vS1 ble det ikke identifisert noen bindingstyper av GalA, selv om det i metanolysen ble vist at ekstraktet inneholder 20,7 % GalA. Det er derfor mulig at karboksylsyregruppene ikke har blitt redusert. En annen årsak til manglende karboksylsyre-reduksjonen kan være at pektinkjedene er så intramolekylært tettpakket at de fysisk hindrer at en reduksjonen kan skje. Molekylets konformasjon kan også ha hindret selve aktiveringen med CMC. GalA ble påvist i 50vS1 og 50vrå så her har syregruppene i hvertfall delvis blitt redusert.

En metode som kanskje kan gi bedre resultater er å utføre en metylering med etterfølgende metanolyse. Det vil da dannes produkter med metylgrupper på karboksylsyregruppene og C-1. Videre reduksjon med NaBD<sub>4</sub> vil kunne redusere de metylforestrede syregruppene. Det kan så utføres hydrolyse, reduksjon og acetylering på vanlig måte (Næss 2003).

### **Manglende hydrolyse**

En annen årsak kan være at hydrolysen har vært ufullstendig. Hydrolysen skjer under relativt milde betingelser ved bruk av TFA. Terminalt bundet arabinose, særlig i furanose form, vil lett spaltes av under en hydrolyse. Denne har også blitt påvist i alle prøvene. Videre har spor av terminalt bundet 4-OH-Me-GlcA/GlcA blitt funnet i 50%rå og 50vS1. Disse vil også lett spaltes av. Årsaken til at 4-OH-Me-GlcA/ GlcA ikke har blitt identifisert i 50vS1 i metanolyse kan være fordi MS har en lavere deteksjonsgrense enn GC.

Ufullstendige resultater etter metyleringsmetode har forekommet tidligere. Det har blitt utviklet en modifisert metode for metyleringsanalyse der nettopp hydrolysetrinnet har blitt endret. Det benyttes da maursyre i stedet for TFA, noe som har vist seg å gi et riktigere forhold mellom terminale enheter og forgreningspunkter i et galaktomannan fra lav (Palsdottir et al. 2007).

### **Tolkning av de bindingstyper som ble påvist**

Basert på resultatene i tabell 4.10 er det vanskelig å si noe om strukturen til polysakkaridene. Det kvantitative forholdet mellom de ulike monosakkaridene og deres bindinger blir ikke korrekt fordi resultatet er så mangelfullt. Resultatene blir likevel forsøkt tolket.

I 50%rå ble det identifisert terminalt bundet arabinose, glukose, galakturonsyre og glukuronsyre /4-OH-Me-glukuronsyre. Det er ikke mulig å skille mellom GlcA og 4-OH-Me-GlcA. Det ble dessuten påvist arabinose (1 → 2) og (1 → 3). Metanolyseresultatet viser at ekstraktet inneholder 21,9 % arabinose. Arabinaner er forgrenede molekyler som består av en hovedkjede av Ara (1 → 5) med sidekjeder av Ara (1 → 2) og Ara (1 → 3). Det kan se ut som at sidekjedene har blitt identifisert. Arabinaner er ofte bundet til galaktaner i pektinkjeden. Testing med Yariv-reagens viste tydelig at ekstraktet inneholder AG-II. Det ble imidlertid ikke identifisert Gal (1 → 3), Ara (1 → 5) eller Gal (1 → 6) ved metyleringsmetoden, så dette kan ikke verifiseres. Tilstedeværelse av mange terminale grupper indikerer at molekylet er høyt forgrenet, men forhold mellom terminale grupper og forgreningspunkter kan ikke beregnes her. En slik konklusjon kan derfor ikke trekkes. Identifikasjon av kun terminale grupper kan indikere at hydrolysen har foregått under for milde betingelser i dette tilfellet.

I 50vS1 ble GalA (1 → 4) og Rha (1 → 2) identifisert. Dette indikerer tilstedeværelse av RG-I, der hovedkjeden består av alternerende 1,4-bundne galakturonsyre og 1,2-bundne rhamnose

#### 4. Resultater og diskusjon

---

enheter. Mengde GalA i forhold til Rha er veldig stort, men dette er i overensstemmelse med metanolyseresultatene. Det kan derfor se ut som det er lange homogalakturenankjeder tilstede. Videre inneholder 50vS1 terminalt bundet Ara, Ara (1 → 5) og Gal (1 → 4). Dette indikerer tilstedeværelse av AG-I. Sidekjer av Ara (1 → 5) er bundet til C-3 i galaktanenheten. Arabinogalaktaner er ofte koblet til rhamnose via C-3 eller C-4 i RG-I. Disse forgreningspunktene ble ikke funnet, noe som kan tyde på at karboksylsyre-reduksjonen ikke har vært fullstendig. Gal (1 → 3) er tilstede, og denne inngår i strukturen til AG-II. Fraksjonen ga dessuten positivt utslag i Yariv-testen. Xyl (1 → 4), terminalt bundet Xyl og Glc (1 → 4) er også identifisert. Dette kan tyde på innhold av en bestemt type hemicellulose, xyloglukaner, noe som kan være vanlig i bær (Ebringerova 2006). Det er også vist at homogalakturenan kan være substituert med xylose. 100vS1 inneholder også mest sannsynlig hemicellulose og arabinaner.

### 5. Konklusjon

Målet med oppgaven var å isolere ulike fraksjoner fra *Vaccinium macrocarpon* på grunnlag av størrelse og ladning, og deretter utføre en karakterisering av de høymolekylære fraksjonene. Videre skulle struktur relatert til biologisk aktivitet undersøkes, inkludert effekt på immunsystemet, påvirkning av CYP-enzymmer og hemming av bakterievekst. Det er ikke tidligere utført strukturstudier på polare, høymolekylære substanser fra *Vaccinium macrocarpon*.

Prøveopparbeidelsen av de ulike fraksjonene viste seg å være problematisk, fordi råekstrakt av 50 % etanol og vann ved både 50 °C og 100 °C dannet gel. Dette førte høyst sannsynlig til tap av polysakkarider ved filtrering og under fraksjonering av råekstrakt på Bio-Gel P-6 DG og ANX Sepharose 4 Fast Flow. Polysakkaridenes evne til å danne gel har nok hatt påvirkning på analyseresultater, fordi dette skaper et løselighetsproblem. I fremtidige studier av *V. macrocarpon* kan ekstraksjonsbetingelsene endres noe, for eksempel ved bruk av pektinesteraser. Ved noe spalting av polymerene kan man muligens øke løseligheten og dermed få et riktigere bilde av komponentenes struktur og biologiske aktivitet.

Analyse av monosakkaridsammensetning viste at alle ekstrakter og fraksjoner inneholdt relativt mye arabinose, galaktose og galakturonsyre. Videre ble det i strukturanalysen vist tilstedeværelse av AG-II i de fleste fraksjonene ved felling med Yariv. Resultatene viste at 50%rå og 50%Bgl hadde høyest innhold av AG-II. Strukturoppklaring ved metyleringsanalyse ga lite resultater på grunn av løselighetsproblemer. Resultatene tyder likevel på at 50vS1 og 100vS1 inneholder noe xyloglukaner, og at det i 50vS1 er lange homogalakturonankjeder og AG-I tilstede.

Mulige årsaker til mangelfulle metyleringsresultater kan i tillegg til løselighetsproblemer også være manglende reduksjon eller hydrolyse. Hvis uronsyrer ikke lar seg redusere kan en mulig metode være å utføre en metylering etterfulgt av metanolysering, og deretter redusering med NaBD<sub>4</sub>, hydrolyse, reduksjon og acetylering på vanlig måte. Hvis hydrolysen ikke har vært fullstendig kan det forsøkes å benytte maursyre i stedet for TFA.

MeAm, 96 %rå og 50%rå viste kraftig hemming av CYP3A4-mediert metabolisme. Videre ble det vist at 50vrå, 100vrå og 50%Bgl stimulerte metabolismen. En mulig forklaring på at

## 5. Konklusjon

---

studier utført tidligere ikke har vist at *V.macrocarpon* påvirker CYP-enzymmer *in vivo* er at komponentenes aktivitet muligens kan oppheve hverandre. Det bør utføres flere studier på dette.

Det ble videre vist at MeAm og 50%rå hemmet vekst av *K.rhizophilia* , *S.aureus* og *P.aeruginosa*. I tillegg hemmet MeAm veksten av *B.subtilis* og 50% rå hemmet vekst av *C. albicans*. 96 %rå hemmet vekst av *P.aeruginosa*. *E.coli* var ikke sensitiv for noen av ekstraktene eller fraksjonene. Resultatene indikerer at *V.macrocarpon* kan ha potensiale som antimikrobielle midler, men det trengs mer forskning på området.

Ekstraktenes og fraksjonenes immunmodulerende effekt ble også testet. Det ble vist at 50%rå, 96%rå og 50%Bgl hadde høyest komplementmodulerende effekt. En av grunnene til at sure fraksjoner av 50 % ekstraktet viste lav antikomplementær effekt kan være tap av aktive polysakkarider under prøveopparbeidelsen. 50%Bgl var den eneste fraksjonen som viste makrofagaktiverende effekt. Dette indikerer at komponenter med modulerende effekt på immunsystemet ble ekstrahert ut i 50 % råekstraktet.

## 6. Referanser

Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Robets, K., Walter, P. (2004). Essential cell biology. *Garland Science*. **2**: 702.

Amersham pharmacia Biotech (2000). ANX Sepharose 4 Fast Flow (high sub), følgeseddel.

Bakken, G.V. (2007). Metabolisme av quetiapin via CYP3A4 og CYP3A5 in vitro. Hovedfagsoppgave i farmakologi, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo.

Bio-Rad Laboratories. (2000). Bio-Gel® P Polyacrylamid Gel. Instruksjonshefte.

Biosupplies Australia PtyLtd. -glucosyl Yariv reagents for detection and quantitation of arabinogalactan-proteins, følgeseddel.

Bruset, S., Tveiten, D. (1999). Helse på grønn resept. *Gyldendal Norsk Forlag*. 214-216.

Burger, O., Weiss, E., Sharon, N., Tabka, M., Neeman, I., Ofek, I. (2002). Inhibition of *Helicobacter pylori* Adhesion to Human Gastric Mucus by a High-Molecular-Weight Constituent of Cranberry Juice. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **42**: 279-284.

Chambers, R. E. og Clamp, J. R. (1971). An assesment of Methanolysis and Other Factors Used in the Analysis of Carbohydrate-Containing Materials. *Biochemical Journal*. **125**:1009-1018.

Christensen, H. (2008). muntlig meddelelse.

Ciucanu, I. og Kerek, F. (1984). A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydrate Research*. **131**: 209-217.

Connell, H., Poulsen, L. K., Klemm, P. (2000). Expression of type 1 and P fimbriae in situ and localisation of a uropathogenic Escheria coli strain in the murine bladder and kidney. *International Journal of Medical Microbiology*. **290**: 587-597.



- Cui, S.W. (2005) Food carbohydrates Chemistry, Physical Properties, and Applications. Taylor and Francis Group. 2-36, 51-78, 108-124.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*. **28** (3) 350-356.
- Ebringerova, A. (2006). Structural Diversity and Application Potencial of Hemicelluloses. *Macromolecular Symposia*. **232**: 1-12.
- Fagredaksjon i NONA. (2001). Helseportalen. Tranebær.  
[http://www.helseportalen.no/arkiv/news\\_top.asp?showID=1281](http://www.helseportalen.no/arkiv/news_top.asp?showID=1281). Hentet 28.11.2007.
- Florence, A. T og Attwood, D. (1998). Physiochemical Principles of Pharmacy. *Palgrave*. **3**: 319-337.
- Foo, Y., Lu, Y., Howell, A. B., Vorsa N. (2000). A-type Proanthocyanidin Trimers from Cranberry that Inhibit Adherence of Uropathogenic P-Fimbriated *Escheria coli*. *Journal of Natural. Products*. **63**: 1225-1228.
- GEHealthcare. (2007). PD-10 Desalting Coloums.  
[http://www.gelifesciences.co.jp/tech\\_support/manual/pdf/chrsalt/52130800.pdf](http://www.gelifesciences.co.jp/tech_support/manual/pdf/chrsalt/52130800.pdf). Hentet 20.04.2007
- Greibrokk T., E. (1998). Ionebytterkromatografi. I Kromatografi. (ed. Greibrokk, T. E., Lundanes, E., Rasmussen, K. E. *Universitetsforlaget*. **3**: 60-79.
- Hansen, M. H. (2000). Sårhelende planter i Mali, Screening av flere planter og videre studier av struktur og aktivitet i polysakkarider fra *Combretum glutinosum*. Feltarbeid i Bandiagara og Sikasso. Hovedfagsoppgave i farmakognosi, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo.
- Harkins, K. J. (2000). Review What`s the use of cranberry juice? *Age and Ageing*. **29**: 9-12.

Hartmann. (2008). Cornell University. *Vaccinium macrocarpon*.

[http://www.entomology.cornell.edu/Extension/Woodys/CUGroundCoverSite/Vaccinium%20macrocarpon\\_photos.html](http://www.entomology.cornell.edu/Extension/Woodys/CUGroundCoverSite/Vaccinium%20macrocarpon_photos.html). Hentet 18.04.08

Heinrich, M., Barnes J., Gibbons S., Williamson E., M. (2004) Fundamentals of Pharmacognosy and phytotherapy. *Churchill Livingstone*. 109.

Hjelmstad, R. (2008). Urtekildens planteleksikon. Amerikansk tranebær.

[http://www.rolv.no/urtemedisin/medisinplanter/vacc\\_mac.htm](http://www.rolv.no/urtemedisin/medisinplanter/vacc_mac.htm). Hentet 20.09.2007.

Howell, A.B., Vorsa, N., Marderosian, A.D., Foo, L.Y. (1998). Inhibition of the adherence of P-fimbriated *Escheria coli* to uroepithelial cells surfaces by proanthocyanidin extracts from cranberries. *The New England Journal of Medicin*. **339** (15): 1085-1086.

Inngjerdengen, K. T. (2000). Sårhelende planter i Mali, A: Videre studier over *Glinus oppositifolius*. B: Feltarbeid i Dogonland og Sikasso. Hovedfagsoppgave i farmakognosi, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo.

Jakobsen, D., Kjeldsen, S. E., Ingvaldsen, B., Lund, K., Solheim, K. (2001). Sykdomslære, Indremedisin, kirurgi og anestesi. *Gyldendal Norsk Forlag*. 189-190.

Jensen, H. D, Krogfelt, K, A., Cornett, C., Hansen, S. H., Christensen, S. B. (2002) Hydrofilic Carboxylic Acids and Iridoid Glycosides in the Juice of American and European Cranberries (*Vaccinium macrocarpon* and *V. oxycoccus*), Lingonberries (*V. vitis-idea*), and Blueberries (*V. myrtillus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **50**: 6871-6874.

Jepson, R. G. og Craig, J. C. (2008). Cranberries for preventing urinary tract infections (Review). *The Cochrane Library*. **(1)**: 1-24.

Kim, J.-B. og Carpita, N. (1992). Changes in Esterification of the Uronic Acid Groups of Cell Wall Polysaccharides during Elongation of Maize Coleoptiles. *Plant Physiology*. **98**: 646-653.

Kreuger, M. og van Holst, G.-J. (1996). Arabinogalactan proteins and plant differentiation. *Plant Molecular Biology* **30**: 1077-1086.

Leitao, D. P. S., Polizello, A. C. M., Ito, I. Y., Spadaro, A. C. C. (2005). Antibacterial Screening of Anthocyanic and Proanthocyanic Fractions from Cranberry Juice. *Journal of medicinal food*. **8** (1): 36-40.

Lid J. (2005). Norsk flora. *Det norske samlaget*, **7**: 599, 607.

Lilja, J. J., Backman, J. T., Neuvonen, P. J. (2007). Effects of Daily Ingestion of Cranberry Juice on the Pharmacokinetics of Warfarin, Tizanidine, and Midazolam—Probes of CYP2C9, CYP1A2, and CYP3A4. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. **81**(6): 833–839.

Lowe, F.C.og Fagelman E. (2001). Cranberry juice and urinary tract infections: What is the evidence? *Urology*. **57** (3): 407-413.

Madigan, M. T., Martiniko, J. M., Parker, J. (2003). Brock biology of microorganisms. *Prentice Hall*. **10**: 704-705, 737-739.

Michaelsen T. E. (2007). Komplementsystemet. Forelesning, FRM 5410. Divisjon for smittevern, Nasjonalt folkehelseinstitutt og Farmasøytisk institutt.

Michaelsen, T. E., Gilje, A., Samuelsen, A. B., Høgåsen, K., Paulsen, B. S. (2000) Interaction between Human Complement and a Pectin Type Polysaccharide Fraction, PMII, from the Leaves of *Plantago major* L. *Scandinavian Journal of Immunology*. **52** (5): 483-490.

Natural resources conservation services, USDA.

<http://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=display&classid=VAMA>. Hentet 15.01.2008.

Nelson, D. L. og Cox, M. M. (2000). Lehninger Principles of Biochemistry. *Worth Publishers*. **3**: 293-321.

## 6. Referanser

---

- Neto, C. C. (2007). Cranberry and Its Phytochemicals: A review of In Vitro Anticancer Studies. *The Journal of Nutrition*. **137**: 186-193.
- Nikolic, Natasa. (2007). CYP3A5 mediated metabolism of midazolam in vitro. Hovedfagsoppgave i farmakologi, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo.
- Norsk legemiddelhåndbok. (2007). <http://www.legemiddelhandboka.no/xml/>. Urinveisinfeksjoner, Interaksjoner. Hentet 25.03.2008.
- Nowack, R. (2007). Cranberry juice- a well- characterized folk-remedy against bacterial urinary tract infection. *Wien Medizinische Wochenschrift*. **157** (13-14): 325-329.
- Næss, H. (2003). Sårhelende planter i Mali. Studier av struktur og aktivitet i polysakkarider fra *Cola cordifolia* bark. Feltarbeid i Bandiagara og Dioila. Hovedfagsoppgave i farmakognosi, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo.
- Palsdottir, B., Omarsdottir, S., Olafsdottir, E. S., Paulsen, B. S. (2007). A modified method for methylation analysis of lichen polysaccharides using formolysis. Poster. Nordic Natural Products Conference.
- Parham, P. (2005). The immune system. *Garland*. **2**: 10-11, 205-249.
- Paulsen, B. S. (2008) Muntlig meddelelse.
- Paulsen, B. S. og Barsett, H. (2005). Bioactive Pectic Polysaccharides. *Advances in Polymer Science*. **186**: 69-101.
- Pedersen-Bjergaard, S. og Rasmussen, K. E. (2004). Legemiddelanalyse. *Fagbokforlaget*. 193-211.
- Pharmacia biotech. Gelfiltration. Principles and Methods. Handbook. 7: 6-7.
- Pharmacia biotech. Ion Exchange Chromatography. Handbook. 10-13.

Postvoll, L. W. (2006). Metabolisme av midazolam via CYP3A4 og CYP3A5 in vitro, utvikling av LC/MS-metode for analyse av hydroksylerte metabolitter. Hovedfagsoppgave i farmakologi, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo.

Promega Corporation. (2005). Griess Reagent System. I Technical Bulletin. INSTRUCTION FOR USE OF PRODUCT G2930. Promega corporation, Madison, WI.

Rang, H. P., Dale M. M., Ritter J. M., Moore P. K. (2003). Pharmacology. *Churchill Livingstone*. **5**: 107-108.

Scheller, H. B. (2007). Plant Biochemistry. Universitetet i København.  
<http://www.uk.plbio.kvl.dk/plbio/cellwall.htm>. Hentet 25.02.2008.

Schepetkin, I. A. og Quinn, M. T. (2006). Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential. *International Immunopharmacology*. **6**: 317-333.

Schmueley, H., Burger, O., Neeman, I., Yahav, J., Samra, Z., Niv, Y., Sharon, N., Weiss, E., Athama, A., Tabak, M., Ofek, I. (2004). Suscebility of *Helicobacter pylori* to the antiadhesion activity of a high-molecular-weight constituent of cranberry. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. **50**: 231-235.

Schols, H. A. og Voragen, A. G. J. (2002). The chemical structure of pectins. I Pectins and their Manipulation.(ed Seymour, G. B. og Knox, J. P.) *Blacwell Publishing*. 149-167.  
1-25.

SigmaAldrich. (2007). Amberlite XAD7HP.  
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/SIGMA/XAD7?REPLACED>  
Hentet 23.11.2007.

Sirnes, E. (2003). Fargestoffer i tropiske planter. Analyse av antocyaner i *Callistemon citrinus*, *Phyllanthus ovafolia* og *Jacaranda mimosifolia*. Hovedfagsoppgave i organisk kjemi, Kjemisk institutt, Universitetet i Bergen.

- Skard, O. (2003) Ville vekster, røtter i kulturhistorien. *Landbruksforlaget*. 122-123.
- Sobota, A. E. (1984). Inhibition of bacterial adherence by cranberry juice: potencial use for the treatment of urinary tract infections. *The Journal of Urology*. **131** (5): 1013-1016.
- Sriamornsak, P. (2003). Chemistry of Pectin and Its Pharmaceutical Uses: A Rewiev. *Silpakorn University International Journal*. **3**: (1-2): 206-228.
- Steinberg, D., Feldman, M., Ofek, I., Weiss, E. I. (2004). Effect of a high-molecular-weight component of cranberry on constituents of dental biofilm. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **54**: 86-89.
- Steinberg, D., Feldman, M., Ofek, I., Weiss, E. I. (2005). Cranberry high molecular weight constituents promote *Streptococcus sobrinus* desorption from artificial biofilm. *International Journal of Antimicrobial Agents*. **25**: 247-251.
- Sweeley, C. C., Bentley, R., Makita, M., Wells, W.W. (1963) Gas-Liquid Chromatography of Trimethylsilyl Derivates of Sugars and Related Substances. *Journal of the American Chemical Society*. **85**:2497-2507.
- Tong, H., Heong, S., Chang, S. (2006). Effect of ingesting cranberry juice on bacterial growth in urine. *American Journal of Health-System Pharmacy*. **63**: 1417-19.
- Tucker, G. A. og Seymour, G. B. (2002). Modification and degradation of pectins. I Pectins and their Manipulation.(ed Seymour, G. B. og Knox, J. P.) *Blacwell Publishing*. 149-167.
- Uesawa, Y., Mohri, K. (2006) Effects of cranberry juice on nifedipine pharmacokinetics in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. **58** (8):1067-1072.
- van Holst, G.-J., Clarke, A. E. (1985). Quantification of Arabinogalactan-Protein in Plant Extracts by Single Radial Gel Diffusion. *Analytical Biochemistry*. **148**: 446-450.

Vvedenskaya, I. O., Robert, T. R., Guido, J. E., Russell, D. J., Mills, K. A., Vorsa, N. (2004). Characterization of Flavonols in Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) Powder. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **52**: 188-195.

Weiss, E. I., Kozlovsky, A., Steinberg, D., Lev-Dor, R., Greenstein, R. B. N., Feldman, M., Sharon, N., Ofek, I. (2004). A high molecular mass cranberry constituent reduces mutans streptococci level in saliva and inhibits in vitro adhesion to hydroxyapatite. *FEMS Microbiology Letters*. **232**: 89-92.

Zafiri, D., Ofek, I., Adar R., Pocino, M., Sharon N. (1989). Inhibitory Activity of Cranberry Juice on Adherence of Type 1 and Type P Fimbriated *Escheria coli* to Eukaryotic Cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **33**: 92-98.